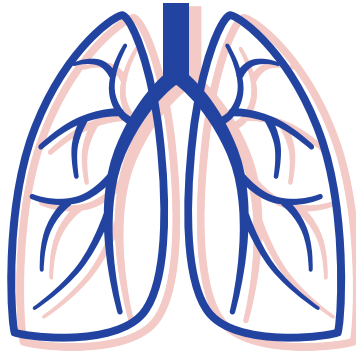


Tilman Graulich

Stereologische Untersuchungen der Gas-Austauschregion
der Lunge und der Innervation der Trachea
bei der tumorkachektischen Maus



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Stereologische Untersuchungen der Gas-Austauschregion der
Lunge und der Innervation der Trachea bei der
tumorkachektischen Maus**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Tilman Graulich
aus Bochum

Hannover 2017

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Geschäftsführende Direktorin:

Prof. Dr. Evelyne Baumgart-Vogt

1. Gutachter: Prof. Dr. Mühlfeld

2. Gutachter: Prof. Dr. Weißmann

Tag der Disputation: 04.09.2017

Inhaltsverzeichnis		Seite
1.	Abkürzungsverzeichnis	VI
2.	Abbildungsverzeichnis	VIII
3.	Tabellenverzeichnis	IX
I.	Einleitung	1
I.1.	Anatomie der unteren Atemwege	1
I.1.1.	Funktion und Metabolismus des Surfactant	4
I.2.	Innervation der Atemwege	6
I.3.	Die Lunge bei Mangelernährung und Anorexie	7
I.4.	Tumorkachexie	9
I.5.	Tumorkachexie und untere Atemwege	10
I.6.	Ziel der Arbeit	11
II.	Material und Methoden	12
II.1.	Tierexperiment	12
II.2.	Präparation und Probengewinnung	12
II.2.1.	Probengewinnung für die Mikroskopie	12
II.2.2.	Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	13
II.3.	Vorbereitung der Proben	13
II.3.1.	Sampling der Proben für die Mikroskopie	13
II.3.1.1.	Vorbereitung der Proben für die Lichtmikroskopie	14
II.3.1.2.	Vorbereitung der Proben für die Immunhistochemie	15
II.3.1.3.	Vorbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie (EM)	17
II.3.1.3.1.	Vorbereitung der Proben für die konventionelle Transmissions- elektronenmikroskopie (TEM)	17
II.3.1.3.2.	Vorbereitung der Proben für die Immunelektronenmikroskopie (Preembedding)	18
II.3.1.3.3.	Vorbereitung der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)	19
II.3.2.	Stereologie	19

II.3.2.1. Volumina	21
II.3.2.2. Oberflächen	23
II.3.2.3. Längen	24
II.3.3. Vorbereitung der Proben für die differentielle Zentrifugation	26
II.4. Statistik	26
 III. Resultate	 27
III.1. Körpergewicht und Lungenvolumina	27
III.2. Mikroskopie	27
III.2.1. Qualitative Mikroskopie	27
III.2.1.1. Lichtmikroskopie	27
III.2.1.2. Immunfluoreszenz Mikroskopie	30
III.2.1.3. Trachealepithel in der	33
Rasterelektronenmikroskopie (REM)	
III.2.1.4. Qualitative Transmissionselektronenmikroskopie	
(TEM)	34
III.2.2. Quantitative Mikroskopie bzw. Stereologie	35
III.2.2.1. Lunge	35
III.2.2.1.1. Volumen der Gasaustauschregion/	
Parenchym	35
III. 2.2.1.2. Alveolaroberfläche	36
III. 2.2.1.3. Alveolarepithelzellen Typ II	36
III. 2.2.1.4. Relation der LB	
zum Alveolarepithel	37
III. 2.2.2. Trachea	38
III. 2.2.2.1. Innervation	38
III. 2.2.2.2. Zusammensetzung	
der Trachealwand	39
III.3. Differentielle Zentrifugation zur Surfactant Bestimmung	41
IV. Diskussion	42
IV.1. Verwendete Methodik	42
IV.1.1. Experimentenaufbau, Probenentnahme, Fixierung	42
IV.1.2. Stereologie	46
IV.1.2.1. Sampling	46

IV.1.2.2. Referenzvolumina	47
IV.1.2.3. Testsysteme der Stereologie	48
IV.1.2.4. Orientierung des Gewebes	50
IV.1.3. Immunhistochemie	51
IV.2. Ergebnisdiskussion	52
IV.2.1. Alveolaroberfläche	52
IV.2.2. Surfactant-Metabolismus	58
IV.2.3. Blutanalyse	60
IV.2.4. Trachealinnervation	61
IV.2.5. Morphologie der Trachea	63
IV.2.5.1. Knorpel	63
IV.2.5.2. Epithel	63
V. Zusammenfassung	65
VI. Summary	67
VII. Literaturangaben	69
VIII. Materialübericht	82
VIII.1 Puffer und Lösungen	82
IX. Lebenslauf	85
X. Danksagung	86
XI. Erklärung	87
XII. Eigene Publikationen	88

1. Abkürzungsverzeichnis:

Abb	Abbildung
ABCA3	ATP-Binding Cassette
AE1-Zellen	Alveolarepithelzelle Typ I
AE2-Zellen	Alveolarepithelzelle Typ 2
AK	Antikörper
art	Arterie
BAL	Bronchioalveoläre Lavage
BGW	Bindegewebe
BMP	Bone Morphogenic Protein
bro	Bronchius
CGRP	Calcitonin-Gen-Related-Peptide
Chondro	Chondrozyt
CLSM	Confocal Laser Scanning Mikroskopie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	Fetales Rinderserum
FEV	Forciertes expiratorisches Volumen
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HRP	Meerrettichperoxidase von engl. Horsradishperoxidase
KG	Kontrollgruppe
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LA	Large Aggregates
LB	Lamellenkörperchen von engl. Lamellar Bodies
LLC	Lewis Lung Carcinoma
LM	Lichtmikroskopie
KGF	Keratinocyte Growth Factor
Mito	Mitochondrien
NANC	Nicht Adrenerg-Nicht Cholinerg
Nuk	Nukleus
nzZ	Nicht zilientragende Zellen
PBS	Phosphatpuffer Salzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor

PFA	Paraformaldehyd
PPAR- γ	Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ
Ref	Referenz
RF	Richardson Färbung
SA	Small Aggregates
SD	Semidünn
SMC	Glatte Muskelzellen von engl. Smooth Muscle Cell
SP	Surfactant Protein
SP-A	Surfactant Protein A
SP-B	Surfactant Protein B
SP-C	Surfactant Protein C
SP-D	Surfactant Protein D
SURS	Systematic Uniform Random Sampling
Tab	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TF	Testfelder
TG	Tumorgruppe
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TK	Tumorkachexie
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
UA+O	Uranylacetat + Osmium
UD	Ultradünn
VEGF a–d	Vascular Endothelial Growth Factor a–d
VIP	Vasoaktives Peptid
ZP	Zytoplasma
zZ	Zilientragende Zellen

2. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung I:	Aufbau der Lunge am Beispiel der Maus	4
Abbildung II:	Sampling der Lungenproben für die Mikroskopie	14
Abbildung III:	Körpergewicht der Tiere bei Beginn (A) und am Ende (B) der Experimente	27
Abbildung IV:	Vergleichende lichtmikroskopische Darstellung des Lungenparenchyms mit Alveolen und Kapillaren	29
Abbildung V:	Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Innervation der Trachea	30
Abbildung VI:	Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Trachea mit 3D-Oberflächenrekonstruktion	32
Abbildung VII:	Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Nervenfasern der Trachea an einem Whole-Mount-Präparat	33
Abbildung VIII:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Trachealepithels	34
Abbildung IX:	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Trachealwand	35
Abbildung X:	Übersicht der stereologischen Daten zum Surfactantsystem nach 21 Tagen	38
Abbildung XI:	Axonlänge der in der Trachea enthaltenen Nervenfasern nach 21 Tagen	39
Abbildung XII:	Vergleich stereologischer Samplingsysteme	47
Abbildung XIII:	Schaubild der gemessenen Wachstumsfaktoren und deren mögliche Auswirkungen	57

3. Tabellenverzeichnis:

Tabelle I:	Verwendete Antikörper (AK)	16
Tabelle II:	Antikörper (AK) für das Preembedding	19
Tabelle III:	Anzahl der Tiere je Gruppe pro untersuchtem stereologischen Wert	20
Tabelle IV:	Übersicht der bestimmten Volumendichten und Volumina	22
Tabelle V:	Übersicht über die Messmethode zur Bestimmung der Volumendichte	22f.
Tabelle VI:	Übersicht der bestimmten Oberflächendichten und Oberflächen	24
Tabelle VII:	Übersicht über die Messmethode zur Bestimmung der Oberflächendichte	24
Tabelle VIII:	Volumen von Lunge und Gasaustauschregion (Parenchym)	36
Tabelle IX:	Oberfläche der Alveolen	36
Tabelle X:	Stereologische Daten der Alveolarepithelzellen Typ II	37
Tabelle XI:	Stereologische Daten zur Innervation der Trachea	39
Tabelle XII:	Stereologische Daten der Trachealwand	40
Tabelle XIII:	Objekte im Raum, deren Repräsentation im Schnittpräparat und stereologische Testsysteme	49
Tabelle XIV:	Quantitative PCR einiger Wachstumsfaktoren in Lungenproben	56
Tabelle XV:	Blutanalyse in TG und KG	61

I. Einleitung

Tumorkachexie (TK) ist ein komplexes Syndrom, das mit diversen Symptomen wie Gewichtsverlust, Hypotrophie von Herz- und Skelettmuskulatur und Anämie verbunden ist (Fox et al. 2009, Loberg et al. 2007). Der Symptomkomplex der Tumorkachexie beinhaltet darüber hinaus bei einem Großteil der Patienten respiratorische Probleme wie die Dyspnoe, welche bisher auf die oben genannten primär extrapulmonalen Veränderungen zurückgeführt wird (Bachmann et al. 2009, Loberg et al. 2007, Coats 2002). Da jedoch noch wenig über die Morphologie und den Metabolismus der Lunge unter diesen Bedingungen bekannt ist, sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob an Lunge und Trachea ein strukturelles Korrelat zu den klinisch beobachteten respiratorischen Symptomen der Tumorkachexie gefunden werden kann. Bei vergleichbarer Gewichtsreduktion ohne Tumor wie bei Anorexie, Malnutrition und Unterernährung steht die Entwicklung eines emphysemähnlichen Zustands der Lunge im Mittelpunkt der Diskussion (Dias et al. 2004, Massaro und Massaro 2004). Ziel dieser Studie sollte es deshalb sein, anhand quantitativer morphologischer Daten die Frage zu klären, ob Lunge und Trachea in einem Tumorkachexie-Modell der Maus Veränderungen aufweisen, die Hinweise auf die beim Menschen beobachtete Dyspnoe geben können.

I.1. Anatomie der unteren Atemwege

Die unteren Atemwege beginnen mit der beim Menschen etwa 10–12 cm langen Trachea (Lufttröhre), die sich an den Larynx (Kehlkopf) anschließt. Die Funktion dieses luftleitenden Abschnitts der unteren Atemwege beruht auf der Erwärmung und Anfeuchtung der eingeatmeten Luft, aber auch dem Abtransport eingeatmeter Fremdstoffe. Letzteres geschieht durch Binden von Partikeln in dem oberflächenaktiven Mucus, Phagozytose durch Makrophagen und Transport durch die Kinozilien des mehrreihigen Flimmerepithels (Reznik 1990).

Histologisch lassen sich an der Trachea vom Lumen ausgehend folgende Wandschichten unterscheiden: die Schleimhaut (Tunica mucosa) mit der Lamina epithelialis und dem darunterliegenden lockeren Bindegewebe der Lamina propria; die uneinheitliche Tunica fibromusculocartilaginea, die je nach Wandabschnitt zu unterschiedlichen Anteilen aus Bindegewebe, glatter Muskulatur und hyalinem Knorpel

besteht und schließlich die Tunica adventitia, die die Trachea mit dem umliegenden Bindegewebe verbindet (Montgomery et al. 1990). Das mehrreihige Flimmerepithel der Trachea besteht aus zahlreichen unterschiedlichen Zelltypen, darunter zilienträgende Zellen, die etwa 32–55% der Epithelzellen der Trachea ausmachen und neben den aktiv beweglichen Kinozilien auch über Mikrovilli verfügen, Basalzellen zur Regeneration des Epithels, sekretorische Zellen, welche den Mucus der Atemwege produzieren, Bürstenzellen, die als Geschmacksrezeptoren zur Immunabwehr beitragen, sowie neuroendokrine Zellen, die entweder in Gruppen (neuroepitheliale Körperchen) oder vereinzelt auftreten (Kummer et al. 2008). Das lockere Bindegewebe der Lamina propria enthält neben Kollagenfasern auch elastische Fasern, die der mechanischen Anpassung bei Ein- und Ausatmung dienen, seromuköse Drüsen (Glandulae tracheales) und u.a. auch Nervenfasern, die vom oder zum Epithel ziehen. Die sich anschließende Tunica fibromusculocartilaginea besitzt hufeisenförmige hyaline Knorpelspangen, deren freie Hörner dorsal durch glatte Muskelfasern und Bindegewebe verbunden werden und die nach kranial und kaudal durch die bindegewebigen Ligamenta anularia miteinander in Verbindung stehen (Laitinen 1985, Montgomery et al. 1990).

An die Trachea schließen sich der rechte und linke Hauptbronchus an, die beide das letzte Stück der extrapulmonalen Atemwege darstellen und sich ihrerseits in die sogenannten Lappenbronchien aufteilen – beim Menschen drei auf der rechten und zwei auf der linken Seite (Weibel und Gomez 1962). Die weitere Aufzweigung der luftleitenden Atemwege erfolgt weitgehend dichotom, das heißt, aus einem Bronchusabschnitt gehen zwei kleinere Bronchien hervor. Dies geschieht über etwa 23 Generationen, bis die Atemwege in kleinen blind endenden Luftbläschen münden, den Alveolen. Bis zur 15. Teilungsgeneration handelt es sich bei den Atemwegen um reine Luftleiter, danach beginnen in der Wand der Atemwege erste bläschenartige Ausstülpungen aufzutreten, die dem Gasaustausch dienen (Weibel 2009). Man spricht vom Übergang der terminalen Bronchioli in die respiratorischen Bronchioli. Von den Hauptbronchien bis zu den Bronchioli unterliegt der Wandbau der Atemwege Veränderungen. So werden die Knorpel Elemente der Wand immer weniger, bis sie in den Bronchiolen ganz fehlen, das Epithel nimmt an Höhe ab, und auch die Zelltypen ändern sich. In den Bronchioli treten sekretorische Epithelzellen als keulenartige Zellen auf, die bis vor Kurzem nach ihrem Erstbeschreiber Max Clara als Clara-Zellen bezeichnet wurden, aber aufgrund dessen negativer Rolle in der Zeit des Nationalsozialismus in der englischen Literatur nun als „club cells“ bezeichnet werden

(Clara 1937, Plopper et al. 1983, Winkelmann und Noack 2010). An die letzten Abschnitte der Bronchioli respiratorii schließen sich die Ductus alveolares an, deren Wände von Alveolen gebildet werden und aus denen dann blind endende Sacci alveolares hervorgehen (Weibel und Gomez 1962). Die am Gasaustausch beteiligte Region der Lunge ist auf ein Minimum an Gewebestrukturen reduziert, nimmt aber etwa 80–90% des gesamten Lungenvolumens ein (Crapo et al. 1983, Stone et al. 1992). Die Wände der Alveolen werden von den Interalveolarsepten gebildet, die ein oder mehrere Alveolen voneinander trennen. An der Oberfläche der Alveolen befindet sich ein einschichtiges Epithel, welches im Wesentlichen von zwei Zelltypen gebildet wird: den Alveolarepithelzellen Typ I und Typ II (AE1- und AE2-Zellen). Während die AE1-Zellen den größten Teil der Alveolaroberfläche bedecken (etwa 95%), bilden die AE2-Zellen zahlenmäßig den größeren Anteil mit etwa zwei Drittel der Epithelzellen. Die AE2-Zellen sind als Progenitorzellen der AE1-Zellen und als Produzenten des Surfactants (siehe unten) von herausragender funktioneller Bedeutung für die Lunge (Crapo et al. 1983, Stone et al. 1992, Weaver et al. 2002). Die zwischen den Epithelien der Interalveolarsepten befindliche Schicht beinhaltet vor allem ein flächiges Kapillarnetz, Fibroblasten sowie von diesen gebildete elastische und kollagene Bindegewebsfasern. Die Konstruktion dieser Interalveolarsepten ermöglicht eine minimale Distanz zwischen der in den Alveolen befindlichen Luft und dem in den Kapillaren befindlichem Blut (Gehr et al. 1978). Während auf einer Seite der Kapillaren oft Bindegewebsfasern oder Ausläufer der Fibroblasten zwischen Endothel und Epithel liegen, ist die Blut-Luft-Schranke auf der anderen Seite auf eine dünne Schicht verringert, die sich aus den Ausläufern der AE1-Zellen, dem Endothel und den miteinander verschmolzenen Basallaminae beider Zellen zusammensetzt. Im Mittel beträgt die Dicke der Blut-Luft-Schranke lediglich 2,2 μm (Gehr et al. 1978). Neben der geringen Diffusionsstrecke für die Atemgase ist nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz (Fick 1855) auch die Größe der für den Austausch zur Verfügung stehenden Fläche von Bedeutung. Durch die enorme Menge von rund 480 Millionen Alveolen (Ochs 2005) beträgt die Diffusionsfläche rund 70–140 m^2 (Gehr et al. 1978).

Der grundsätzliche Aufbau der Atemwege ist beim Menschen und anderen Säugetieren sehr ähnlich. Zwar bestehen Unterschiede hinsichtlich der Aufzweigung und der Epithelzusammensetzung der luftleitenden Atemwege, auch kommt im Alveolarepithel beispielsweise der Ratte ein dritter Zelltyp vor, die alveolare Bürstenzelle, dennoch ist es bemerkenswert, dass über Gewichtsunterschiede zwischen etwa 2 g bei der

Etruskerspitzmaus bis hin zu mehreren Tonnen beim Elefanten der grundsätzliche Aufbau der Atemwege bei landlebenden Säugern nur so geringfügig variiert (Gehr et al. 1978, Crapo et al. 1983, Stone et al. 1992, Wirkes et al. 2010).

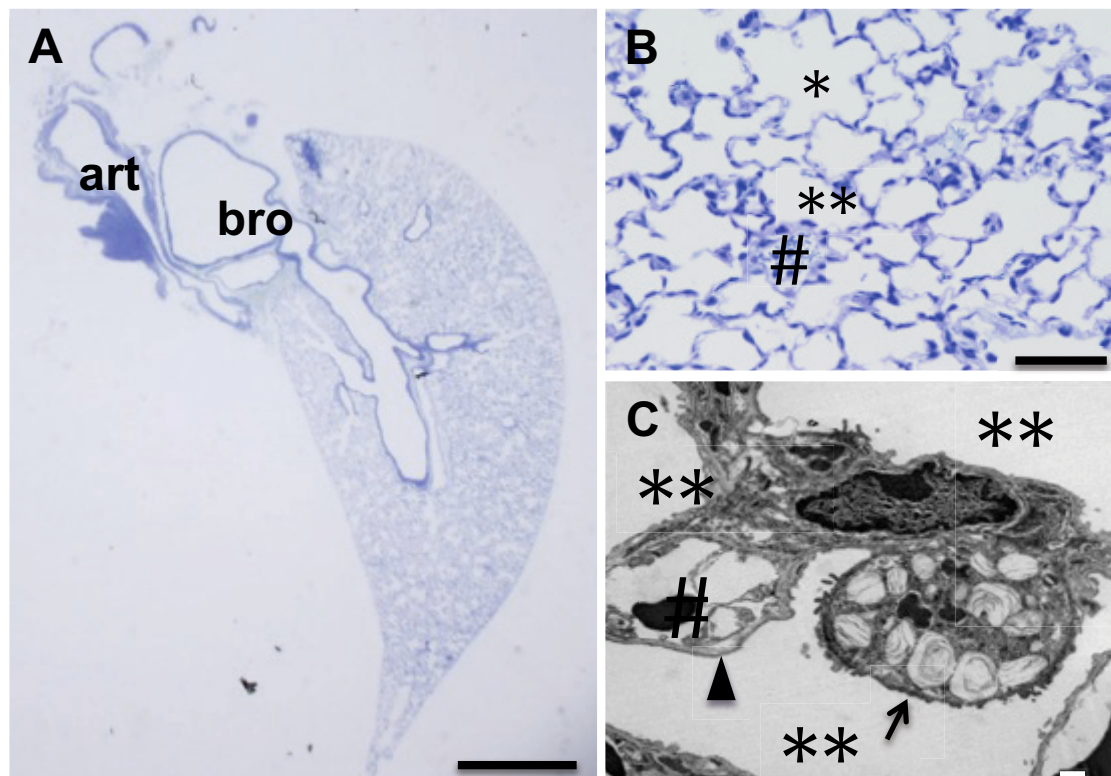


Abb. 1: Aufbau der Lunge am Beispiel der Maus. A: Übersicht eines Lungenlappens mit Parenchym und sich nach distal aufteilendem Bronchus. Maßstab 3,2 mm B: Alveolarregion der Lunge, Maßstab: 146 μm , C: Aufbau der Interalveolarepten, Maßstab: 250 nm. bro: Bronchus; art: Arterie; *: Ductus alveolaris mit umliegenden Alveolen, die je durch ein Septum interalveolare getrennt sind; **: Alveole; #: Kapillare mit Erythrozyt/-en; Pfeil: AE2-Zelle mit Lamellenkörperchen; Pfeilspitze: AE1-Zelle mit Zellausläufer.

I.1.1. Funktion und Metabolismus des Surfactant

Ungefähr 5–10% der Oberfläche des Alveolarepithels werden von AE2-Zellen gebildet, die über tight und gap junctions sowie Adhärenskontakte mit AE1-Zellen verbunden sind. Durch einen hauchdünnen Flüssigkeitsfilm auf dem Alveolarepithel, welcher als Transsudat aus den Kapillaren stammt, erhöht sich in den Alveolen die Oberflächenspannung und erzeugt so eine zentripetale Kraft, die danach strebt, die Oberfläche zu verkleinern. Um dem Kollaps der Alveolen aufgrund der gesteigerten Oberflächenspannung entgegenzuwirken, produzieren AE2-Zellen eine oberflächenaktive Substanz, im englischen ein „surface active agent“, welches als Namen das Akronym Surfactant trägt (Weaver et al. 2002, Brasch et al. 2003, Bensch und Schaefer und Avery 1964). Surfactant besteht zu 80–90% aus Lipiden (überwiegend Phospholipide) sowie zu rund 10–20% aus Proteinen, u.a. den Surfactant-

Proteinen (SP) SP-A, SP-B, SP-C und SP-D (Rau et al. 2004) und wird innerhalb der AE2-Zellen in 1-2 μm^3 großen Lamellenkörperchen (Lamellar bodies, LB) gespeichert (Bensch und Schaefer und Avery 1964, George und Hook 1984).

SP-B und SP-C, beides hydrophobe Proteine, sind strukturell eng miteinander verwandt und gelangen über das endoplasmatische Retikulum in den Golgi-Apparat und anschließend über multivesikuläre Körperchen durch Fusion in die Lamellenkörperchen. Ohne SP-B enthalten AE2-Zellen multiple kleine Vesikel, wobei diese keine Lamellen enthalten und die Ausbildung des Surfactant-Films nicht möglich ist (Brasch et al. 2003). SP-C Knockout-Mäuse hingegen bilden normale LB und einen normalen extrazellulären Surfactant-Film, was vermuten lässt, dass SP-C für die Verpackung in die LB und deren Sekretion nicht zwingend erforderlich ist. Auch scheint unklar, ob das gesamte Fehlen oder auch nur die fehlerhafte Expression von SP-C einen Krankheitswert hat (Hamvas 2010). SP-A und SP-D sind hydrophile kollagenähnliche Glykoproteine, die zusammen für die angeborene Immunität der Lunge eine große Rolle spielen (Goldmann et al. 2009), u.a. bei der Abwehr von *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae* Typ A und *Aspergillus fumigatus* (Goldmann et al. 2009). Auch wenn SP-A und SP-D wohl keine so herausragende Bedeutung für die Bildung und Funktion des Surfactants besitzen wie SP-B, wurden doch bei Fehlen dieser Proteine in genetisch veränderten Mäusen Störungen der Homöostase des in AE2-Zellen gespeicherten und in die Alveole sezernierten Surfactants beobachtet.

Der Weg der Phospholipide in die Lamellenkörperchen ist nicht vollständig verstanden. Neu synthetisierte Phospholipide gelangen über das endoplasmatische Retikulum und über Phospholipidtransporter sowie ATP-Binding Cassette (ABCA3), membranassoziierten Transportern auf der Oberfläche der LB, in diese hinein. Neben diesem wurden zwei weitere Lipidtransporter auf der Oberfläche von LB entdeckt. Hierzu gehören ABCA8A und ATP8A1 (Ridsale et al. 2011).

Als Trigger für die Sekretion des Surfactants aus den LB scheint Kalzium zu dienen. Es gibt hierfür zwei Theorien: Zum einen scheint es durch die bei Inspiration gedehnten Alveolen zu einer gesteigerten Spannung in den AE2-Zellen zu kommen. Dieser mechanische Reiz führt zu einem Kalziumeinstrom und zur Exozytose der LB. Verstärkt wird dieser Effekt durch die Dehnung von AE1-Zellen, die über gap junctions Kalzium in die AE2-Zellen leiten. Zum anderen scheinen die in vitro nachgewiesenen

Reizungen der β -adrenergen, Adenosin- und purinergen Rezeptoren, die Exozytose der LB zu beeinflussen (Weaver et al. 2002).

Nach der Inaktivierung des sezernierten Surfactants wird dieses entweder durch Alveolarmakrophagen abgeräumt oder durch AE2-Zellen wieder aufgenommen und lysosomal abgebaut oder zurück in den Syntheseweg des Surfactants eingeschleust.

I.2. Innervation der Atemwege

Trachea und Bronchien werden durch afferente (sensible) und efferente (parasympathische und sympathische) Nervenfasern innerviert. Die parasympathischen präganglionären Axone gelangen von den Nuclei dorsalis vagi und ambiguus mit dem N. vagus bzw. dessen N. laryngeus recurrens zu den Atemwegen, wo sie in organnahen Ganglien auf die postganglionären Neurone umgeschaltet werden. Die sympathischen präganglionären Axone verlaufen von den Seitenhörnern des Rückenmarks über die Spinalnerven zu dem Hals- und oberen Brustabschnitt des Truncus sympathicus, wo sie ihrerseits auf postganglionäre Neurone umgeschaltet werden. Neben den klassischen Transmittersubstanzen Acetylcholin (Parasympathicus) (Mann 1971) und Noradrenalin (Sympathicus) (Kummer et al. 1992, Lundberg et al. 1983) der postganglionären Neurone besitzen diese häufig auch noch Neuropeptide als weitere Mediatoren. Die afferenten Fasern gelangen von den Atemwegen überwiegend mit dem N. vagus, zu geringeren Teilen mit Ästen der Spinalnerven zum Zentralnervensystem. Die Perikaryen dieser pseudounipolaren Neurone befinden sich dementsprechend in den Vagusganglien (Ganglion jugulare und nodosum) oder den entsprechenden Spinalganglien (Plato et al. 2006).

Vegetative Nervenfasern werden über die ganze Länge der Trachea gefunden (Leitinin 1985). Sie dienen u.a. der Modulation folgender Prozesse: Spannung der glatten Gefäßmuskulatur, Schleimsekretion, vaskuläre Permeabilität, Aktivität des Immunsystems. Sympathische Fasern innervieren Blutgefäße der Bronchien und Glandulae submucosae, jedoch nur geringfügig die glatte Muskulatur. Parasympathische Fasern, deren Dichte von proximal nach distal abnimmt, führen über muskarinische M3-Rezeptoren zur Bronchokonstriktion, Vasodilatation und zu erhöhter Mucussekretion. Die sensiblen Nervenfasern leiten Informationen über mechanische und chemische Reize innerhalb der Atemwege und sind so über Reflexschleifen an der Regulation vieler wichtiger Prozesse beteiligt wie dem Hustenreflex, der Schleimproduktion, der Atemfrequenz und -tiefe sowie der Bronchokonstriktion. Neben

den genannten vegetativen und sensiblen Nervenfasern werden noch weitere Nervenfasern unterschieden, die man keinem einheitlichen System zuordnen kann und die durch die Nicht-Zugehörigkeit zum sympathischen oder parasympathischen System als nicht-adrenerge-nicht-cholinerge (NANC) (Fischer und Mayer und Kummer 1996) Nervenfasern bezeichnet werden. Die Mediatoren dieses Systems sind überwiegend Neuropeptide wie calcitonin-gene-related-peptide (CGRP) oder vasoaktives Peptid (VIP) (Dey und Shannon und Said 1981) und beteiligen sich ebenfalls an der Regulation der oben genannten Prozesse. Aufgrund der Bedeutung dieser Vorgänge für die Atmung ist es nicht überraschend, dass neuronale Dysfunktionen an der Entstehung und den Symptomen zahlreicher respiratorischer Erkrankungen (z.B. Asthma und COPD) beteiligt sind und ihre Beeinflussung im Zentrum therapeutischer Bemühungen steht.

I.3. Die Lunge bei Mangelernährung und Anorexie

Zu den Auswirkungen von Minder- oder Mangelernährung auf die Morphologie und Funktion der Lunge sind in der Literatur vielfältige und kontrovers diskutierte Beobachtungen zu finden. Im Mittelpunkt der Arbeiten steht die Frage, ob reduzierte Kalorienaufnahme, reduziertes Körpergewicht oder Mangel an einzelnen Nahrungsbestandteilen zu der Entwicklung eines Lungenemphysems führen können. Ein Emphysem der Lunge ist morphologisch durch eine Reduktion der alveolären Gasaustauschfläche und eine Aufweitung der distalen Luftwege gekennzeichnet (Taraseviciene-Stewart und Voelkel 2008). Abzugrenzen hiervon ist die pulmonale Kachexie bei COPD-Patienten, die durch eine verstärkte Atemarbeit gegen die Obstruktion der verengten Atemwege und den dadurch erhöhten Energieverbrauch entsteht (Schols 2002).

Bei kalorienreduziert ernährten Ratten konnten Massaro und De Carlo Massaro (2004) innerhalb weniger Tage eine Verringerung der Alveolaroberfläche und eine Vergrößerung der Alveolen nachweisen, die mit einem erhöhten Kollagengehalt und verminderten elastischen Fasern der Alveolarsepten einherging. Des Weiteren konnte eine reduzierte Konzentration des wichtigsten Surfactantlipids, Phosphatidylcholin, festgestellt werden, was auf eine Beteiligung der AE2-Zellen hindeutet. Weitere Arbeiten deuten darauf hin, dass diese Veränderungen reversibel sind, da es nach Wiederbeginn der normalen Nahrungsmenge zu einer Neubildung von AE1-, AE2- und Endothelzellen kommt, was sich auch in der erhöhten Expression verschiedener

Wachstumsfaktoren wie „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF) oder „Transforming growth factor beta“ (TGF- β) widerspiegelt (Riley und Thakker-Varia 1995, Massaro et al. 2007). Bei längeren Zeiträumen der Mangelernährung (etwa vier Wochen) wiesen Ratten eine Verminderung der intrazellulären Surfactantmenge sowie der durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnenen intra-alveolären Menge an Lipiden und Proteinen auf (Dias et al. 2004). Darüber hinaus waren funktionelle Parameter wie statische Elastizität und intrathorakaler Druck bei Mangelernährung gegenüber der normalernährten Kontrollgruppe im Sinne eines Emphysems verändert (Dias et al. 2004). Friday zeigte bereits 1970 an Ratten, die er für 48–69 Stunden hungern ließ und die entweder auf Wasser, Nahrung oder beides verzichten mussten, in der BAL Flüssigkeit: 1.) bei Wasserverzicht eine geringere Oberflächenspannung, 2.) bei Nahrungsverzicht eine erhöhte Oberflächenspannung, und 3.) eine normale Oberflächenspannung bei Verzicht sowohl von Nahrung als auch von Wasser. Ein ernährungsbedingtes verändertes Verhältnis aus Produktion und Verlust oberflächenaktiver Substanzen wurde vermutet (Friday 1970) und konnte zumindest bei 1–4 Tage hungernden Ratten beobachtet werden.

Diesen Arbeiten stehen Studien gegenüber, die keine Hinweise auf ein Emphysem entdecken konnten. So wurde zwar bei dreiwöchiger kalorienreduzierter Ernährung bei Mäusen ein Verlust an Elastizität und ein erhöhtes Residualvolumen festgestellt, aber kein histopathologischer Befund eines Emphysems (Bishai und Mitzner 2008). Die Surfactantveränderungen konnten zwar auch von Thet und Alvarez (1982) bestätigt werden, allerdings führte dies nicht zu einer Beeinflussung der Oberflächenspannung. Allerdings verstärkte Hungern die durch Hyperventilation hervorgerufene Vergrößerung der Oberflächenspannung. Es wäre z.B. denkbar, dass eine veränderte Surfactant-Zusammensetzung in Kombination mit einer Tachypnoe und Hyperventilation bei Patienten mit Tumorkachexie das Gefühl der Dyspnoe auslöst.

Neben einer Unterernährung aufgrund von reduziertem Nahrungsmittelangebot können auch psychische Ursachen eine verminderte Nahrungsaufnahme bewirken (Anorexia nervosa). Pieters et al. (2000) zufolge zeigten Patienten mit Anorexia nervosa eine Verringerung des maximalen inspiratorischen und expiratorischen Drucks sowie ein vergrößertes Residualvolumen aber kein Emphysem, während Coxon et al. (2004) die im CT gefundene geringere Gewebedichte bei Anorexie-Patienten durch die Entwicklung eines Emphysems erklärten.

I.4. Tumorkachexie

Tumorkachexie ist beim Menschen definiert als ein Gewichtsverlust innerhalb von 6 Monaten um mindestens 5% des ursprünglichen Körpergewichtes (Fox et al. 2009). Diese Reduktion kann entweder Folge einer verminderten Nahrungsaufnahme oder bei unveränderter bzw. gesteigerter Nahrungszufuhr auftreten. Über 80% der Patienten, die an gastrointestinalen Tumoren leiden und über 60% der Patienten mit Lungentumoren haben bei Diagnosestellung einen signifikanten Gewichtsverlust. Dieser Gewichtsverlust stellt bei 20–40% der Tumorpatienten die direkte Todesursache dar (Fox et al. 2009).

Am Gewichtsverlust bei tumorkachektischen Patienten scheint eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse beteiligt zu sein. Hierbei sind neben der gegebenenfalls auftretenden Anorexie auch Malnutrition, Zytokine (Interleukin-1, -6, Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)), Veränderungen des Hormonhaushalts (Insulin, Leptin, Ghrelin, Adiponectin) sowie ein erhöhter Metabolismus des Tumorgewebes für die Gewichtsreduktion verantwortlich. Der vermehrte Energieverbrauch des Tumorgewebes führt zu einer verstärkten anaeroben Energiegewinnung und größeren Laktatproduktion des Körpers. Dieses wird in der Leber zu Glukose regeneriert. Da dieser Prozess jedoch dreimal mehr Energie benötigt, als der anaerobe Glukoseverbrauch erzeugt, kommt es trotz konstanter Nahrungsaufnahme zu einem Verlust der Energiereserven. Diese werden in Form von Skelettmuskulatur und Fettgewebe mobilisiert. Es kommt zur Reduktion der Skelettmuskulatur und des Fettgewebes (Loberg et al. 2007). Dieser Prozess ist unabhängig von der Größe des Tumors und kann daher nicht die alleinige Ursache der Kachexie sein. Zytokine führen unabhängig von Größe und Energieverbrauch des Tumors zur Ausbildung der TK (Fox et al. 2009, Toomey et al. 1995, Tracy et al. 1988).

TNF- α als prominenter Vertreter dieser proinflammatorischen Zytokine ist in den meisten Fällen der TK erhöht und steigert durch Bindung an den TNF-Rezeptor-2 auf der Oberfläche von Skelettmuskelzellen deren Apoptoserate (Tolosa et al. 2005). Nach Tracy et al. induziert TNF- α bei Mäusen nach Implantation eines Lungenkarzinoms (Lewis lung carcinoma, LLC) die Ausbildung einer TK mit Anämie und Inflammation (Tracy et al. 1988). Dieser Mechanismus ließ sich durch die Injektion von anti-TNF- α -Antikörpern revidieren, was jedoch keinen Einfluss auf die Reversibilität der Anämie und Inflammation hatte (Sherry et al. 1989).

Auch die Entwicklung einer Insulinresistenz spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der TK, da hierdurch die Glukoseaufnahme in den Zellen gestört ist (Pajak et al. 2008).

Darüber hinaus zählen neben dem Verlust der Skelettmuskulatur und des Fettgewebes auch Schwäche, Schmerzen, Schwellungen durch den Tumor, Osteoporose, Anämie, kardiale Probleme und Dyspnoe zu den prominentesten Problemen bei Tumorkachexie.

I.5. Tumorkachexie und untere Atemwege

Sauerstoffgehalt und Kohlendioxidmenge im Blut werden durch Chemorezeptoren gemessen und mit Normalwerten im ZNS verglichen. Weichen die gemessenen Werte zu weit nach unten ab, wird dies durch eine gesteigerte Atemfrequenz und Atemtiefe kompensiert (MacDonald 1995). Ist diese Kompensation nicht mehr möglich, entsteht bei den Patienten Atemnot (Dyspnoe). Zwischen 20% und 80% der Tumorpatienten leiden unter Dyspnoe. Diese kann direkt durch den Tumor hervorgerufen werden (z.B. großer mediastinaler Tumor, V. cava superior-Syndrom, Verlegung der Atemwege bei Lungentumor oder Metastasen), als Begleiterscheinung der Tumorerkrankung (Kachexie, kardiale Kachexie, Anämie, Embolie, Infektion) auftreten, durch die Tumorthherapie (Chemotherapie, Radiatio, Operation) entstehen und macht sich subjektiv als Atemnot bemerkbar (Loberg et al. 2007, Coats 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Tumorpatienten mit TK signifikant häufiger an Dyspnoe leiden als Tumorpatienten ohne TK (Fox et al. 2009). Unterstützt wird diese Aussage insbesondere durch die Arbeit von Bachmann et al. (2009), die zeigt, dass Patienten mit einem Pankreaskarzinom und einer Gewichtsreduktion von 5% keine Reduktion der Vitalkapazität oder des forcierten expiratorischen Volumens (FEV1) aufweisen, jedoch Patienten mit einer Gewichtsreduktion von mehr als 10%, also einer ausgeprägten TK, eine Reduktion der Vitalkapazität zeigen. Unklar bleibt, ob die Kachexie oder der Tumor jeweils allein oder in Kombination zu einer Veränderung der Strukturen der unteren Atemwege führen.

I.6. Ziel der Arbeit

Gewichtsverlust, Hypotrophie der Skelettmuskulatur, Anämie und kardiale Kachexie sind als Symptome der Tumorkachexie bekannt und wurden bisher ursächlich für die Entwicklung einer Dyspnoe bei Tumorpatienten angesehen (Fukuda et al. 2009). In der Literatur ist darüber hinaus wenig über die direkten Auswirkungen auf die Morphologie der Lunge und der Trachea bekannt und darüber, ob etwaige Veränderungen mit ursächlich sind für die Entwicklung einer Dyspnoe im Rahmen der TK. Anorexie-Experimente an Nagern, die eine vergleichbare Gewichtsreduktion zeigen, lassen vermuten, dass es bedingt durch Mangelernährung zu einem Verlust der Alveolaroberfläche sowie zur Ausbildung eines Emphysems (Karlinsky et al. 1986, Dias et al. 2004) und zu Veränderungen im Surfactant-Metabolismus kommt (Weis und Jurrus 1971). Diese Ergebnisse sind jedoch umstritten (Bishai und Mitzner 2008). Die kürzlich morphologisch beobachtete Reduktion der myokardialen Innervation (Mühlfeld et al. 2011) wirft vielmehr die Frage auf, ob ähnliche Veränderungen in Lunge und Trachea ggf. im Rahmen eines paraneoplastischen Syndroms zu finden sind. Aufgrund dieser Ausgangslage sollten in dieser Arbeit mit Hilfe eines TK-Modells der Maus folgende Hypothesen überprüft werden. Experimentelle TK führt

- analog zur Kalorienreduktion zu einer Reduktion der Alveolaroberfläche sowie
- einer Reduktion der intra- und extrazellulären Surfactantmenge,
- zu einem hypotrophen Zustand der Trachealwand und
- analog zum Herzen zu einer Reduktion der die Trachea innervierenden Nervenfasern.

Die Ergebnisse sollten klären, ob die bei der Maus durch Tumorimplantation erzeugte Kachexie direkte Auswirkungen auf Morphologie und Metabolismus der Lunge und der Trachea hat. Darüber hinaus sollte diskutiert werden, ob beobachtete Veränderungen ursächlich für das bei Tumorpatienten bekannte Symptom der Dyspnoe sein könnten.

II. Material und Methoden

II.1. Tierexperiment

Acht bis neun Wochen alte weibliche C57Bl6 Mäuse wurden bei einem 12h-Tag- und 12h-Nachtzyklus gehalten und zufällig in eine Kontrollgruppe (KG; Körpergewicht (Mittelwert plus/minus Standardabweichung): $19,98 \text{ g} \pm 0,43 \text{ g}$) und eine Tumorgruppe (TG; Körpergewicht: $19,76 \text{ g} \pm 0,75 \text{ g}$) eingeteilt. Standardlabornahrung wurde beiden Gruppen ad libidum zur Verfügung gestellt. Den Tieren der Tumorgruppe wurden 2×10^6 LLC einer exponentiell wachsenden Zellkultur, denen der Kontrollgruppe das gleiche Volumen einer Phosphatpuffer-Salzlösung (PBS) subkutan in die Nackenregion injiziert. Die Tumorzellkultur wuchs in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit hoher Glukosekonzentration und 10% fetalem Rinderserum (FBS), 2 mM L-Glutamine und 1% Penicillin-Streptomycin. Nach 21 Tagen wurden die Tiere beider Gruppen getötet und Proben zur weiteren Verwendung entnommen. Die Mäuse wurden in einer Kammer, die mit 2 ml Isofluran gefüllt war, getötet. Die vom österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung genehmigten Versuche (GZ 66.010/0085-II/10b/2009) wurden im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation mit Prof. Gerald Höfler, Medizinische Universität Graz, von Dr. Suman Kumar Das unter strikter Einhaltung der Empfehlungen des National Institute of Health (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) durchgeführt.

II.2. Präparation und Probengewinnung

Thorax und Abdomen wurden mit einer Schere durch einen median-sagittalen Schnitt geöffnet und die Trachea bis zum Kehlkopf freipräpariert.

II.2.1. Probengewinnung für die Mikroskopie

Bei jeweils neun Mäusen pro Gruppe wurde anschließend eine Kanüle über den Kehlkopf in die Trachea vorgeschoben und durch eine Ligatur fixiert. Hierüber wurde bei einem hydrostatischen Druck von 20 cm über dem Versuchstier eine Fixierlösung instilliert, bestehend aus 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS. Nach vollständiger Füllung der Lunge wurde die Kanüle entfernt und die Ligatur unmittelbar unterhalb des Kehlkopfes festgezogen. Das gesamte Thorax-Organpaket wurde herauspräpariert und in Fixierlösung für mindestens 24 h bis zur weiteren Verwendung kühl gelagert.

II.2.2. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Eine Kanüle wurde umgehend in die freipräparierte Trachea (n = 5 in TG und n = 8 in KG) eingebracht. Die rechte Lunge wurde mit dreimal 350 µl PBS-Lösung lavagiert. Die BAL-Flüssigkeit wurde vom Zellpellet durch Zentrifugation (300 x g, 10 min, 4°C; Biofuge, Heraeus, Hanau) getrennt, und der Überstand wurde bei -80°C in flüssigem Stickstoff gekühlt und gelagert, um anschließend das Verhältnis von aktivem Surfactant (large aggregates, LA) zu inaktivem Surfactant (small aggregates, SA) zu bestimmen.

II.3. Vorbereitung der Proben

II.3.1 Sampling der Proben für die Mikroskopie

Zur Bestimmung des Referenzvolumens wurden linke und rechte Lunge von der Trachea getrennt und separat am Hilus festgehalten und unter Wasser getaucht. Die Gewichts Differenz wurde mit einer Feinwaage gemessen und entsprach nach dem Archimedes-Prinzip dem Gewicht des verdrängten Wassers. Bei bekannter Dichte von 1 g x cm⁻³ des Wassers konnte hierüber das Volumen der Lunge bestimmt werden (Scherle 1970). Das Volumen der Trachea wurde mit Hilfe des Cavalieri-Prinzips bestimmt (Michel und Cruz-Orive 1988).

Lungen und Luftröhren wurden von Apex nach Basis bzw. senkrecht zu ihrer Längsachse jeweils in etwa 1 mm dicke, parallele Scheibchen geschnitten. Mittels „Systematic Uniform Random Sampling“ (SURS) (Mayhew 1991, Gundersen und Jensen 1987) wurde je ein Drittel der Lungen- und Tracheaprobe für die konventionelle Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der Lunge bzw. die Immunelektronenmikroskopie (Preembedding) der Trachea, die konventionelle Lichtmikroskopie (LM) und Immunhistochemie ausgewählt. Hierzu wurde für jedes Tier separat eine Zahl zwischen eins und drei den verschiedenen Proben zugewiesen. Beispielsweise wurde zufällig die Zahl eins für den Startpunkt der Probe für die Immunhistochemie, respektive die Zahl zwei für die TEM-Probe sowie die Zahl drei für die LM-Probe ausgewählt. Ausgehend von ihrem Startpunkt wurde jede dritte Probe ihrer entsprechenden Gruppe zugeordnet. Aufgrund der Größe der Lungenscheibchen wurden diese einem weiteren Samplingschritt, wie oben beschrieben, unterzogen (Abb. II).

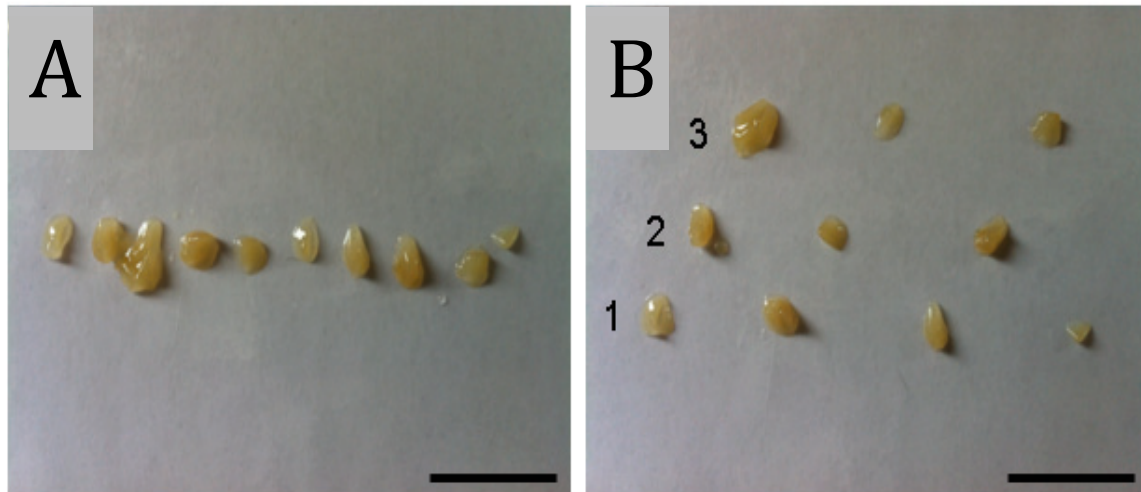


Abb. II: Sampling der Lungenproben für die Mikroskopie. Die Lungenproben wurden in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten und in drei Gruppen eingeteilt. Maßstab ca. 12 mm A: ca. 1 mm dicke Lungenblöckchen, B: Einteilung der in A gezeigten Lungenblöckchen in die drei Gruppen, 1: LM, 2: TEM, 3: Immunohistochemie. Maßstab ca. 10 mm.

II.3.1.1. Vorbereitung der Proben für die Lichtmikroskopie

Die Proben wurden in Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim), einem Glykol-Methacrylat, von dem sich sehr dünne Schnitte ($1\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$) für die Lichtmikroskopie anfertigen lassen, eingebettet. Hierzu wurden die Lungen jeweils 5×15 Minuten in $0,15\text{ M}$ Hepes-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie für zwei Stunden in $0,5\%$ Osmiumtetroxid in Aqua dest. gegeben und erneut 5×15 Minuten, diesmal jedoch in Aqua dest. gewaschen. Das in dieser Arbeit verwendete Aqua dest. wurde mit einer Millipore-Anlage bereitgestellt. Über Nacht wurden die Proben in halbgesättigtes Uranylacetat in Aqua dest. gegeben. Anschließend wurden die Proben viermal 10 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Danach wurden sie mit einer aufsteigenden Verdünnungsreihe von jeweils 2×10 Minuten in 70% , 80% , 90% , 100% Aceton dehydriert. Die Proben wurden bei der anschließenden Präinfiltration für zwei Stunden in eine Lösung aus Aceton (100%) und Basislösung Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim) im Verhältnis $1 : 2$ gegeben. Die Infiltration wurde mit 100 ml Basislösung + 1 g Härter I (= 1 Beutel; Heraeus Kulzer, Wehrheim) über Nacht durchgeführt. Am nächsten Tag erfolgte die Polymerisation, bei der zu je 15 ml Vorbereitungslösung 1 ml Härter II (Heraeus Kulzer, Wehrheim) gegeben wurde. Die Proben wurden in Silikonformen gefüllt und mit der endgültigen Technovit-Lösung (Heraeus Kulzer, Wehrheim) übergossen. Bis diese vollständig auspolymerisiert war und geschnitten werden konnte, dauerte es etwa 24 Stunden.

Die in Technovit eingebetteten Proben wurden nach dem Aushärten aus den Formen genommen und auf Holzblöckchen mit Zweikomponentenkleber fixiert, um diese am Mikrotom (Leica RM 2255, Wetzlar) einspannen zu können. Die überstehenden Kanten wurden mit einer Rasierklinge abgetrennt, um eine möglichst geringe Schnittfläche zu erhalten. Die Schnittdicke lag bei ca. 1,5 µm. Die in einem Wasserbad (22°C) schwimmenden Schnitte wurden auf einen Glas-Objektträger aufgenommen und danach auf einer Heizplatte (58–59°C) für wenige Minuten getrocknet. Die Präparate wurden nun mittels Richardson-Färbung markiert, wozu einige Tropfen Färbelösung für 10 Minuten auf den Schnitt gegeben wurden. Die überschüssige Färbelösung wurde mit Aqua dest. abgewaschen. Die Schnitte wurden mit Entellan zwischen Objektträger und Deckglas fixiert.

II.3.1.2. Vorbereitung der Proben für die Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden die Proben aus dem formaldehydhaltigen Fixativ für 12 Stunden in 0,1 M Phosphatpuffer überführt. Der Phosphatpuffer wurde anschließend vier Mal jeweils nach einer Stunde gewechselt. Anschließend wurden die Proben für weitere 12 Stunden in 18 prozentiger wässriger Saccharoselösung gewaschen, um sie bei dem darauffolgenden Einfrieren in Tissue-Tek® O.C.T.™ vor dem Auskristallisieren des Wassers zu schützen.

Von den eingefrorenen Proben wurden am Kryostaten, Leica CM 1900 (Leica, Bensheim), 8–10 µm oder ca. 30 µm dicke Schnittpräparate gewonnen und auf Objektträgern (Langenbrinck, Emmendingen) fixiert. Die Schnitte wurden für eine Stunde mit Histoblocklösung und anschließend über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurden die Schnitte dreimal für 10 Minuten in PBS gewaschen, bevor sie für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden. Der sekundäre Antikörper wurde für 10 Minuten in 4% PFA in Aqua dest. fixiert und überschüssiges PFA zwei Mal für 10 Minuten abgewaschen, bevor der Schnitt mit gepuffertem Glycerol eingedeckelt wurde. Die Schnitte wurden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Die dünneren Schnitte wurden an einem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging (Zeiss, Jena), ausgestattet mit einer AxioCam MRm Kamera (Zeiss, Jena), betrachtet, die 30 µm dicken Präparate wurden mit einer Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) LSM 710 T-PMT (Zeiss, Oberkochen) analysiert.

Etwa 1 mm dicke Trachealringe wurden als Whole-Mount-Proben ventral durchtrennt, aufgeklappt und so in Tissue-Tek® eingefroren. Anschließend wurden sie für 2 Stunden in 1% Triton permeabilisiert und entsprechend des Protokolls für die Immunhistochemie präpariert. Die Inkubationszeit für Primär- und Sekundärantikörper war hier allerdings jeweils eine ganze Nacht.

Tab. I: Verwendete Antikörper (AK)

	Antikörper	Hersteller (Katalognummer)	Verdünnung
Lunge, Trachea 8 µm Dicke:			
Primärer AK:	rab-α-PGP 9.5	Biotrend, Köln (BT78-6305-04)	1/8000 in PBS+S
Sekundärer AK:	dk-α-rb-Cy3	Chemicon, USA (AP182C)	1/2000 in PBS+S
	Dapi		1/500 in PBS+S
Trachea 30 µm:			
Primärer AK:	rab-α-PGP 9.5	Biotrend, Köln (BT78-6305-04)	1/4000 in PBS+S
Sekundärer AK:	dk-α-rb-Cy3	Chemicon, USA (AP182C)	1/2000 in PBS+S
sowie:			
Primäre AK:	rab-α-PGP 9.5	Biotrend, Köln (BT78-6305-04)	1/8000 in PBS+S
	α-SMC-actin-FITC gekop.	Sigma Aldrich, Seelze (F3777)	1/1000 in PBS+S
Sekundärer AK:	dk-α-rb-Cy3	Chemicon, USA (AP182C)	1/2000 in PBS+S
	Dapi	Sigma-Aldrich, Seelze (D9542)	1/500 in PBS+S
Whole-Mount-Trachea:			
Primärer AK:	rab-α-PGP 9.5 I	Biotrend, Köln (BT78-6305-04)	1/4000 in PBS+S
Sekundärer AK:	dk-α-rb-Cy3	Chemicon, USA (AP182C)	1/2000 in PBS+S

Legende: AK: Antikörper, Dapi: Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA, rab-α-PGP 9.5: primärer AK in Kaninchen produziert, der Nervenfasern markiert, dk-α-rb-Cy3: Fluoreszenzfarbstoff, der in Eseln produziert wurde und an das Fc Fragment des primären-Kaninchen Antikörpers bindet, α-SMC-actin-FITC gekoppelt: direkt an den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein isothiocyanate (FITC) gekoppelter primärer AK zur Markierung des Aktins in glatten Muskelzellen.

II.3.1.3. Vorbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie

II.3.1.3.1. Vorbereitung der Proben für die konventionelle Transmissions-elektronenmikroskopie

Alle Proben wurden zur Verbesserung des Erhalts der Ultrastruktur zunächst in 1,5% Glutaraldehyd, 1,5% Paraformaldehyd in 0,15 M Hepes-Puffer für mindestens 24 Stunden nachfixiert. Die Proben wurden danach in 0,15 M Hepes-Puffer jeweils 5 x 10 Minuten gewaschen und danach für zwei Stunden in 1% Osmiumtetroxid in Aqua dest. inkubiert. Nach zwei Stunden wurde das überschüssige Osmium in drei Schritten von jeweils 10 Minuten mit Aqua dest. herausgewaschen. Über Nacht wurden die Proben in halb gesättigter wässriger Uranylacetatlösung blockkontrastiert. Das Uranylacetat musste zuvor filtriert werden, um Präzipitate zu vermeiden. Am zweiten Tag wurde das überschüssige Uranylacetat zweimal für 15 Minuten aus dem Gewebe gewaschen. Für die weitere Bearbeitung wurden die Proben jeweils 10 Minuten in 30%, 50%, 70%, 90% und 100% Alkohol entwässert. In letzterem wurden die Proben ein weiteres Mal für 10 Minuten entwässert, um sicher zu stellen, dass auch letzte Wasserrückstände beseitigt wurden. Die Proben wurden für weitere 15 Minuten in eine Mischung aus Ethanol und Propylenoxid (1:2) gelegt. In dieser Zeit wurde Propylenoxid und Epon im Verhältnis 1:2 vorbereitet, in welches die Proben für weitere 60 Minuten gegeben wurden. Anschließend wurden die Proben über Nacht in reines Epon gegeben. Danach wurden die Proben im Exsikkator (Pfeifer, Wetzlar) für 2 Stunden entgast und schließlich für 48 Stunden bei 60°C im Wärmeschrank (Heraeus Kulzer, Wehrheim) ausgehärtet. Zur Erleichterung der Ultramikrotomie wurden die Epon-Blöcke mit Hilfe einer rotierenden Diamantfräse angetrimmt (TM 60, Reichert, München, Deutschland). Für die Elektronenmikroskopie wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Reichert Ultracut E, Leica, Wetzlar, Deutschland) 50–70 nm dicke Schnitte angefertigt. Die Proben wurden dann in einem mit Aqua dest. gefüllten Trog gesammelt. Von hier aus wurden sie auf ein 200 quadratische Maschen umfassendes Kupfer-Rhodium-Netz (SCI Science, München) aufgezogen. Angefertigt wurden von jedem Block drei Schnitte. Schließlich wurden die Netzchen in halb gesättigtem Uranylacetat für 10 Minuten nachkontrastiert, nochmals mit Aqua dest. fünfmal für je zwei Minuten gewaschen, in Reynold's Lösung vier Minuten nachkontrastiert und schließlich fünfmal je zwei Minuten in Aqua dest. gewaschen.

II.3.1.3.2. Vorbereitung der Proben für die Immunelektronenmikroskopie (Preembedding)

Bei dieser Methode wird vor der Einbettung für die Elektronenmikroskopie eine antikörperbasierte Darstellung eines ausgewählten Moleküls durchgeführt, daher der Name „Preembedding“.

Hierfür wurden von den zuvor in Tissue-Tek® gefrorenen Proben am Kryostaten Leica CM 1900 (Leica, Wetzlar) 40 µm dicke Schnitte gewonnen. Von jedem Tier wurden drei Trachealringe à 40 µm für das Preembedding angefertigt. Ein weiterer Schnitt wurde als Negativkontrolle verwendet, wobei der primäre Antikörper nicht hinzugegeben wurde, sondern durch die gleiche Flüssigkeitsmenge (ml) PBS+S ersetzt wurde. Zunächst wurde jeder Schnitt in Uhrmachergläser gegeben, dann in PBS dreimal für 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurde normales Schweineserum (10%) als Blocklösung benutzt und für eine Stunde auf die Schnitte aufgebracht. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (rab- α -PGP-9.5-I) erfolgte über Nacht.

Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen und für eine Stunde mit dem direkt gekoppelten Sekundärantikörper (swine- α -rab-IG-HRP) inkubiert. Die Schnitte wurden 1 x 5 Minuten in PBS und 2 x 5 Minuten in Tris HCl gewaschen und anschließend in einer Lösung zur elektronendichten Nickelverstärkung (Lösung 1 – 10 Minuten, Lösung 2 – 45 Minuten).

Die Visualisierung erfolgte durch die DAB-Reaktion mit Meerrettich Peroxidase (HRP) und HCl. Diese Reaktion führte zu einer Braunfärbung der markierten Axone. Nach dreimaligem Waschen in Tris HCL wurden die Trachealringe nach dem oben beschriebenen Protokoll in Epon eingebettet.

Die Proben wurden zwischen zwei transparenten Plastikfolien im Trockenschrank bei 60°C durch ein Gewicht beschwert, orientiert und getrocknet. Anschließend wurden sie mit Gewebekleber auf vorgefertigte Eponblöcke aufgeklebt, um für die TEM geschnitten zu werden.

Tab. II: Antikörper (AK) für das Preembedding

Probe/Schnittdicke	Antikörper	Hersteller (Katalognummer)	Verdünnung
Trachea 40 µm Dicke:			
Primärer AK:	rab- α -PGP 9.5 I	Biotrend, Köln BT78-6305-04	1/8000 in PBS+S
Sekundärer AK:	swine- α -rab-IG- HRP	Dako, Hamburg P 0217	1/100 in PBS+S

Legende: rab- α -PGP 9.5: primärer AK in Kaninchen produziert der Nervenfasern markiert, swine- α -rab-IG-HRP: sekundärer, HRP gekoppelter AK, der im Schwein produziert wurde und an das Fc-Fragment des primären AK bindet.

II.3.1.3.3. Vorbereitung der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur Analyse der Oberflächenmorphologie des Trachealepithels wurden zufällig entnommene Tracheaprobe von je drei Sham- und Tumor-Tieren für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet. Hierzu wurden die Luftröhrenstücke longitudinal mit einem Skalpell in zwei Hälften geteilt. Die Proben wurden aus der Fixierlösung (4% PFA) 3 x 15 Minuten lang in 0,15 M Hepes-Puffer gewaschen und über 30 Minuten osmiert (1% Osmiumtetroxid in Aqua dest.). Überschüssiges Osmium wurde in drei Waschgängen von je 5 Minuten mit Reinstwasser ausgewaschen. Für die sich anschließende kritische Punkttrocknung im Critical Point Dryer CPD 030 (Bal-TEC, Schalksmühle) musste das Gewebe zuvor 4 x 15 Minuten lang in 1,2-Dimethoxypropan entwässert werden. Abschließend wurden die Proben mit Leit-C (Neubauer, Münster), einem elektrisch leitfähigen Kleber, auf Träger (Leit-Tabs) aufgeklebt und an der Sputter-Anlage E5000 (Polaron, West Sussex, England) mit Goldatomen bedeckt. Die Aufnahmen wurden an einem Rasterelektronenmikroskop (Philips XL 30) aufgenommen.

II.3.2. Stereologie

Anhand von zweidimensionalen lichtmikroskopischen und transmissionselektronenmikroskopischen Präparaten wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Stereologie, quantitative Daten über die dreidimensionale Morphologie der gesamten Lunge und Trachea gesammelt und die Ergebnisse zwischen TG und KG verglichen. Voraussetzung dabei war, ein Sampling der Organe, Proben und Schnitte durchzuführen, das die Repräsentativität der betrachteten Areale für das gesamte

Gewebe gewährleistet. Nur Schnitte mit einer guten Strukturhaltung sowie ein adäquates Messinstrument in Form eines Zählrasters wurden verwendet. Die Herleitung des passenden Zählrasters wird in Abschnitt IV.1.2.3. (S. 48) erläutert. Die analysierten Parameter sind in Tab. IV und VI zusammengefasst. Tab. III zeigt die Anzahl der Tiere die je Gruppe verwendet wurden.

Tab. III: Anzahl der Tiere je Gruppe pro untersuchtem stereologischen Wert

Untersuchter Wert	Anzahl der Tiere je Gruppe (n)
V(Lunge) [mm ³]	9
V(Parenchym,Lunge) [mm ³]	9
S(Alvepi,Parenchym) [cm ²]	9
V(AE2,Parenchym) [mm ³]	9
\bar{v}_N (AE2) [μm ³]	9
V(LB,AE2) [μm ³]	9
V(Mito,AE2) [μm ³]	9
V(Nuk,AE2) [μm ³]	9
L(Axon,Trachea) [mm/μm]	6
S(Axon,Trachea) [mm ² /μm] x 10 ³	6
V(Axon,Trachea) [mm ³ /μm] x 10 ³	6
V(Knorpel,Trachea) [μm ³ /μm] x 10 ⁶	6
V(Epithel,Trachea) [μm ³ /μm]*10 ⁶	6
V(zZ,Trachea) [μm ³ /μm]	6
V(nzZ,Trachea) [μm ³ /μm]	6
V(BGW,Trachea) [μm ³ /μm]*10 ⁶	6
V(SMC,Trachea) [μm ³ /μm]*10 ⁶	6
V(Chondro, Trachea) [mm ³ /cm]	6

Legende: V(Lunge): Volumen der Lunge, V(Parenchym,Lunge): Volumen des Lungenparenchyms, S(Alvepi,Parenchym): Oberflächen des Alveolarepithels, V(AE2,Parenchym): Volumen der AE2 Zellen

im Lungenparenchym, \bar{v}_N (AE2): Mittlere Anzahl der AE2 Zellen in der Lunge, V(LB,AE2): Volumen der LB in den AE2 Zellen, V(Mito,AE2): Volumen der Mitochondrien in den AE2 Zellen, V(Nuk,AE2): Volumen des Zellkerns in den AE2 Zellen, L(Axon,Trachea): Länge der Axone in der Trachea, S(Axon,Trachea): Oberfläche der Axone in der Trachea, V(Axon,Trachea): Volumen der Axone in der Trachea, V(Knorpel,Trachea): Volumen des Trachealknorpel, V(Epithel,Trachea): Volumen des Trachealepithels, V(zZ,Trachea): Volumen der zZ in der Trachea, V(nzZ,Trachea): Volumen der nzZ in der Trachea, V(BGW,Trachea): Volumen des BGW in der Trachea, V(SMC,Trachea): Volumen der Trachealmuskulatur, V(Chondro, Trachea): Volumen des Trachealknorpels.

II.3.2.1. Volumina

Die Referenzvolumina ($V(\text{Ref})$) wurden, wie oben beschrieben, für die Lunge nach dem Prinzip von Scherle (1970) durch die Verdrängung von Wasser bestimmt. Für die Referenzvolumina der Trachea sowie der darin enthaltenen Kompartimente Epithel ($V(\text{Epithel})$), Knorpel ($V(\text{Knorpel})$), Bindegewebe (BGW) ($V(\text{BGW})$) und glatte Muskulatur ($V(\text{SMC})$) wurde die Cavalieri Methode, beschrieben von Michel und Cruz-Orive (1988), benutzt. Hierfür wurden in Epon eingebettete 0,8 μm dicke Semidünnschnitte der Trachea mit Richardson-Färbung markiert. An einem Olympus BX51 Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg), ausgestattet mit einer Olympus DP72 Digitalkamera und einem Computer (Windows) mit newCast Software (Visiopharm, Horsholm, Dänemark), wurden die Schnitte betrachtet.

Durch die Projektion eines Punkterasters auf den Schnitt wurde $V(\text{Ref})$ wie folgt errechnet:

$$V(\text{Ref}) = \Sigma P_{\text{Schnitt}} \times a/p \times L(\text{Trachea}) \quad (\text{Formel 1})$$

wobei $\Sigma P_{\text{Schnitt}}$ die Summe der auf die Trachea fallenden Punkte, a/p die einem einzelnen Punkt zuzuordnende Fläche und $L(\text{Trachea})$ die Länge der Trachea bezeichnet (Michael und Cruz-Orive 1988). Durch Multiplikation von den auf die Trachea fallenden Punkten mit der Fläche pro Punkt und der Gesamtlänge der Trachea ergibt sich das Gesamtvolumen.

Generell kann über die Bestimmung einer Volumendichte ($V_V(\text{Struktur}/\text{Ref})$) und die Multiplikation mit dem entsprechenden Referenzvolumen $V(\text{Ref})$ das Gesamtvolumen der betrachteten Struktur ($V(\text{Struktur})$) bestimmt werden.

Hierbei gilt

$$V_V(\text{Struktur}/\text{Ref}) = \Sigma P(\text{Struktur}) / \Sigma P(\text{Ref}) \quad (\text{Formel 2})$$

und

$$V(\text{Struktur}) = V_V(\text{Struktur}/\text{Ref}) \times V(\text{Ref}) \quad (\text{Formel 3})$$

mit $\Sigma P(\text{Struktur})$ als die Summe der Punkte, die auf die Struktur fallen, und $\Sigma P(\text{Referenzraum})$ die Summe der Punkte, die im gesamten Referenzraum gezählt

werden. Mit Hilfe des single-section Disectors (Sterio 1984) und des von Vedel-Jensen und Gundersen (1993) beschriebenen Rotators, einer Methode zur Bestimmung des Volumens einer Struktur, wurde das anzahl-gewichtete mittlere Volumen der AE2-Zellen ($\bar{v}_N(\text{AE2/Parenchym})$) bestimmt.

Tab. IV: Übersicht der bestimmten Volumendichten und Volumina

Parameter Abkürzung	Bedeutung
$V_V(\text{AE2/Parenchym})$	Volumendichte der AE2 Zellen im Parenchym der Lunge
$\bar{v}_N(\text{AE2})$	Durchschnittliches Volumen der AE2-Zellen
$V_V(\text{LB/AE2})$	Volumendichte der LB in den AE2-Zellen
$V_V(\text{ZP/AE2})$	Volumendichte des Zytoplasmas in den AE2-Zellen
$V_V(\text{Mito/AE2})$	Volumendichte der Mitochondrien in den AE2-Zellen
$V_V(\text{Nuk/AE2})$	Volumendichte des Nukleus in den AE2-Zellen
$V_V(\text{Parenchym/Lunge})$	Volumendichte des Parenchyms in der Lunge
$V_V(\text{Knorpel/Trachea})$	Volumendichte des hyalinen Knorpels in der Trachea
$V_V(\text{Epithel/Trachea})$	Volumendichte des Epitels in der Trachea
$V_V(\text{zZ/Epithel})$	Volumendichte der zilientragenden Zellen im Trachealepithel
$V_V(\text{nzZ/Epithel})$	Volumendichte der nicht-zilientragenden Zellen im Trachealepithel
$V_V(\text{BGW/Trachea})$	Volumendichte des Bindegewebes in der Trachea
$V_V(\text{SMC/Trachea})$	Volumendichte der glatten Muskulatur in der Trachea
$V_V(\text{Chondro/Knorpel})$	Volumendichte der Chondrozyten im Trachealknorpel
$V_V(\text{Lipid/Chondro})$	Volumendichte der Lipidspeicher in den Chondrozyten
$V_V(\text{Axon/Trachea})$	Volumendichte der Axone in der Trachea

Tab. V: Übersicht über die Messmethode zur Bestimmung der Volumendichte

Parameter Abkürzung	Schnitt	Färbung	Vergrößerung	Mikroskop	Raster
$V_V(\text{AE2/Parenchym})$	SD	RF	x100	LM	200 Punkte pro TF
$\bar{v}_N(\text{AE2})$	SD	RF	x100	LM	IUR Rotator
$V_V(\text{LB/AE2})$	UD	UA+O	x7002	TEM	19 Punkte pro TF
$V_V(\text{ZP/AE2})$	UD	UA+O	x7002	TEM	19 Punkte pro TF
$V_V(\text{Mito/AE2})$	UD	UA+O	x7002	TEM	19 Punkte pro TF
$V_V(\text{Nuk/AE2})$	UD	UA+O	x7002	TEM	19 Punkte pro TF
$V_V(\text{Parenchym/Lunge})$	SD	RF	x10	LM	4 Punkte pro TF
$V_V(\text{Knorpel/Trachea})$	SD	RF	x10	LM	Cavalieri, 400 Punkte pro TF

Parameter Abkürzung	Schnitt	Färbung	Vergröße- rung	Mikroskop	Raster
V _V (Epithel/Trachea)	SD	RF	x10	LM	Cavalieri, 400 Punkte pro TF
V _V (zZ/Epithel)	UD	UA+O	x3988	TEM	19 Punkte pro TF
V _V (nzZ/Epithel)	UD	UA+O	x3988	TEM	19 Punkte pro TF
V _V (BGW/Trachea)	SD	RF	x10	LM	Cavalieri, 400 Punkte pro TF
V _V (SMC/Trachea)	SD	RF	x10	LM	Cavalieri, 400 Punkte pro TF
V _V (Chondro/ Knorpel)	SD	RF	x10	LM	Cavalieri, 400 Punkte pro TF
V _V (Lipid/Chondro)	UD	UA+O	x3988	TEM	19 Punkte pro TF
V _V (Axon/Trachea)	UD	UA+O	x21560	TEM	45 Punkte pro TF

Legende: SD: Semidünn, UD: Ultradünn, RF: Richardson-Färbung, TF: Testfeld, UA+O: Uranylacetat + Osmium, LM: Lichtmikroskop, TEM: Transmissionselektronenmikroskop.

II.3.2.2. Oberflächen

Die Oberfläche einer Struktur (S(Struktur)) kann durch die Multiplikation von Referenzvolumen und Oberflächendichte ($S_V(\text{Struktur/Ref})$) bestimmt werden. Bei der stereologischen Bestimmung von Oberflächen ist zu beachten, dass die Orientierung/Ausrichtung der Probe Einfluss auf die Analyse hat. Dementsprechend ist eine Vorausrichtung nötig, sodass die Probe bzw. die Kombination aus Probe und Testsystem isotrop ist. Das Parenchym der Lunge wird in aller Regel als isotrop angesehen, weshalb keine weitere Randomisierung der Orientierung durchgeführt wurde. Die Trachea hingegen hat eine Vorzugsrichtung, die aus Gründen der Auswertbarkeit beibehalten werden sollte. Aus diesem Grund wurde hier das Prinzip der Vertical Sections angewendet.

Kurz gesagt wurden bei der Oberflächenbestimmung des Lungenparenchyms gerade, parallel angeordnete Testlinien verwendet, während bei der Trachea ein Testsystem mit sog. Zykloiden (Cycloids) verwendet wurde, die entlang einer zum Lumen hin gerichteten vertikalen Achse ausgerichtet waren. Nach Projektion des jeweiligen Testrasters auf die mikroskopischen Aufnahmen wurden die Schnittpunkte der Testlinien (I) mit der Oberfläche der Struktur gezählt.

Die Anzahl der Schnittpunkte multipliziert mit dem Faktor 2, dividiert durch die Gesamtlänge aller Testlinien auf dem Referenzraum (L_T) ergibt $S_V(\text{Struktur/Ref})$.

$$S(\text{Struktur}) = S_V(\text{Struktur/Ref}) \times V(\text{Ref}) \quad (\text{Formel 4})$$

L_T ergibt sich aus dem Produkt der gezählten Linienendpunkte (ein Punkt pro Linie), die auf dem Referenzraum fallen und der Länge einer Testlinie l_t . Durch Multiplikation der Oberflächendichte mit dem zugehörigen Referenzraum ergibt sich die Gesamtoberfläche der Struktur.

$$S_V(\text{Struktur}) = (2 \times I) / L_T \quad (\text{Formel 5})$$

$$L_T = l_t \times \Sigma P(\text{Ref}) \quad (\text{Formel 6})$$

Tab. VI: Übersicht der bestimmten Oberflächendichten und Oberflächen

Parameter Abkürzung	Bedeutung
$S_V(\text{Alvepi/Parenchym})$	Oberflächendichte des Alveolarepithels im Parenchym der Lunge
$S_V(\text{Axon/Trachea})$	Oberflächendichte der Axone in der Trachea

Tab. VII: Übersicht über die Messmethode zur Bestimmung der Oberflächendichte

Parameter Abkürzung	Schnitt	Färbung	Vergrößerung	Mikroskop	Raster
$S_V(\text{Alvepi/Parenchym})$	SD	RF	x40	LM	4 Linien pro TF
$S_V(\text{Axon/Trachea})$	UD	UA+O	x21560	TEM	45 Cycloid Arc pro TF

Legende: SD: Semidünn, UD: Ultradünn, Richardson Färbung: RF, TF: Testfeld, UA+O: Uranylacetat + Osmium, LM: Lichtmikroskop, TEM: Transmissionselektronenmikroskop.

II.3.2.3. Längen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gesamtlänge aller Axone in der Trachea bestimmt. Hierzu wurde die von Mühlfeld et al. (2010) beschriebene Methode zur Quantifizierung der Innervation des Herzens und anderer Organe über die Bestimmung der Gesamtlänge der Nervenfasern benutzt und hinsichtlich der Besonderheiten der Trachea angepasst. An Ultradünnschnitten von in Epon eingebetteten Trachealringen, an denen durch Preembedding die Axone immunmarkiert waren, wurde zunächst die Volumendichte der Axone $V_V(\text{Axon})$ bestimmt. Hierzu wurden TF am Elektronenmikroskop Leo 906 (Zeiss, Oberkochen) bei 21.560-facher Vergrößerung

durch SURS der Schnitte erlangt. Alle 10 µm wurde untersucht, ob im TF Nervenfasern angeschnitten waren. War dies der Fall, wurde eine digitale Aufnahme gemacht, auf die ein Punkteraster projiziert wurde. Es wurden die Punkte gezählt, die auf ein Axon P(Axon) fallen und diejenigen Punkte, die auf das Referenzvolumen fallen. Die Anzahl der TF ohne Nervenfasern wurde gezählt und mit der Anzahl der Punkte pro Punkteraster multipliziert. Hieraus wurde die Summe aller Punkte auf dem Referenzvolumen P(Ref) berechnet. Es wurde folgende Formel benutzt:

$$V_V(\text{Axon/Trachea}) = P(\text{Axon}) / P(\text{Trachea}) \quad (\text{Formel 7})$$

Aufgrund der präparationsbedingten Heterogenität der Tracheallänge wurde das Gesamtvolumen der Axone ($V(\text{Axon})$) pro µm Längeneinheit der Trachea errechnet.

Die TF zur Bestimmung der Oberflächendichte der Axone ($S_V(\text{Axon/Trachea})$) waren dieselben wie die zur Bestimmung von $V_V(\text{Axon/Trachea})$. Hierfür wurde jedoch ein Raster bestehend aus 45 Zykloiden à 250 µm Länge auf die TF projiziert und die Schnittpunkte der axonalen Membran mit den Cycloiden gezählt. $S_V(\text{Axon/Trachea})$ wurde mit Formel 5 und 6 berechnet. Wie für $V(\text{Axon, Trachea})$ wurde auch $S(\text{Axon, Trachea})$ pro µm Trachea berechnet.

Die Gesamtlänge der Axone $L(\text{Axon,Trachea})$ pro µm Trachea wurde schließlich ermittelt, indem die Modellannahme getroffen wurde, dass Axone als zylindrische Strukturen betrachtet werden und sich demnach Länge, Oberfläche und Volumen nach einfachen geometrischen Regeln verhalten.

Demnach wäre

$$V(\text{Axon,Trachea}) = \pi \times r(\text{Axon,Trachea})^2 \times L(\text{Axon,Trachea}) \quad (\text{Formel 8})$$

und

$$S(\text{Axon,Trachea}) = 2 \times \pi \times r(\text{Axon,Trachea}) \times L(\text{Axon,Trachea}) + 2 \times \pi \times r(\text{Axon,Trachea})^2 \quad (\text{Formel 9})$$

wobei $r(\text{Axon,Trachea})$ dem mittleren Radius der Axone entspricht. Ferner wurde $2 \times \pi \times r(\text{Axon,Trachea})^2$ als Oberfläche der Oberseite und Unterseite der Axone in Relation

zur Gesamtoberfläche als vernachlässigbar erachtet und gleich 0 gesetzt. Formel 8 wurde nach $r(\text{Axon}, \text{Trachea})$ aufgelöst und für $r(\text{Axon}, \text{Trachea})$ in Formel 9 substituiert.

Hieraus ergab sich:

$$L(\text{Axon}, \text{Trachea}) = \frac{(1/4\pi) \times (S(\text{Axon}, \text{Trachea}))^2}{V(\text{Axon}, \text{Trachea})} \quad (\text{Formel 10})$$

II.3.3. Vorbereitung der Proben für die differentielle Zentrifugation

Die Bestimmung des Verhältnisses von aktiven (large aggregated, LA) zu inaktiven Surfactantformen (small aggregates, SA) wurden in der BAL enthaltenen SAs und LAs durch Dr. Clemens Ruppert, Wissenschaftlicher Mitarbeiter der med. Klinik II des Universitätsklinikum Gießen Marburg, mit differentieller Zentrifugation voneinander getrennt. Dies geschah bei $48.000 \times g$ für 1 h bei 4°C .

Das LA enthaltende Pellet wurde in 0,9% NaCl in Aqua dest. überführt. Die relative Menge an LA wurde bestimmt, indem die in der LA-Fraktion enthaltenen Phospholipide in Relation zur Gesamtmenge der in der BAL-Flüssigkeit enthaltenen Phospholipide gesetzt wurde. Die Menge an Phospholipiden wurde aus der ursprünglichen BAL-Flüssigkeit und der LA-Fraktion entsprechend dem Protokoll von Bligh und Dyer (1959) herausgelöst. Diese wurden durch den Calorimetric Phosphorus Assay quantifiziert (Rouser et al. 1970).

II.4. Statistik

Der arithmetische Mittelwert beider Gruppen (TG und KG) wurde berechnet und zwischen beiden Gruppen verglichen. Als Maß für die Verteilung der Werte um den arithmetischen Mittelwert wurde die Standardabweichung mit dem Statistikprogramm PASW Version 20.0 (SPSS, Zürich) bestimmt. Ein p-Wert von $< 0,05$ im Mann-Whitney-Test wurde als statistische Signifikanz betrachtet. Bei $0,05 < p < 0,1$ zwischen den Gruppen wurde dies als Tendenz gewertet (Curran-Everett und Benos 2004).

III. Resultate

III.1. Körpergewicht und Lungenvolumen

Das initiale Körpergewicht war nicht unterschiedlich zwischen beiden Gruppen, während das finale Körpergewicht in TG, 21 Tage nach der Tumor-Zell-Injektion, reduziert war. Das mittlere Tumorgewicht war $2,47 \pm 0,56$ g in TG. Eine deutliche Gewichtsreduktion und Tumorkachexie in TG konnte somit beobachtet werden. Das Lungenvolumen wies dagegen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf (TG: $483,77 \pm 67,53$ mm³ KG: $460,44 \pm 44,31$ mm³) ($p = 0,190$).

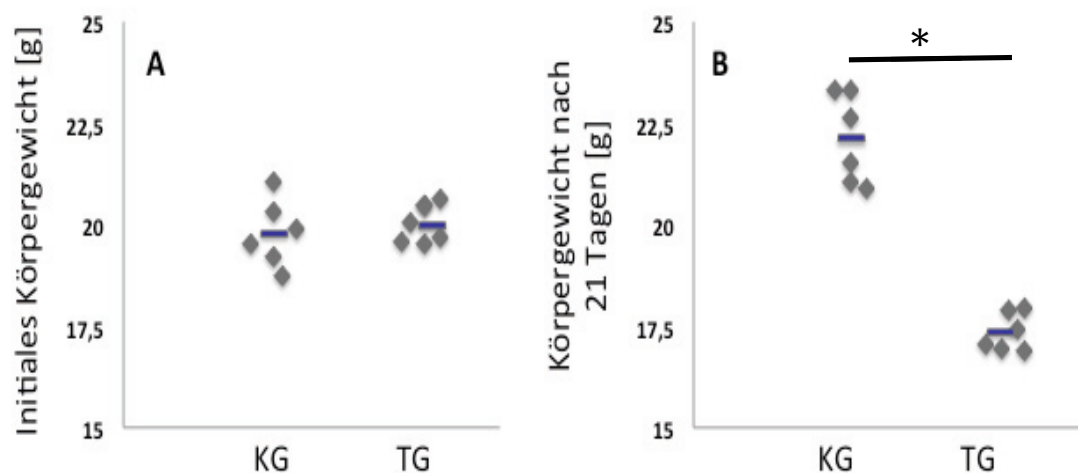


Abb. III: Körpergewicht der Tiere bei Beginn (A) und am Ende (B) der Experimente. KG (Kontroll Gruppe); TG (Tumor Gruppe). Horizontal, kurzer Balken: Statistischer Mittelwert der jeweiligen Gruppe.

III.2. Mikroskopie

III.2.1. Qualitative Mikroskopie

III.2.1.1. Lichtmikroskopie

Abb. IV zeigt exemplarisch die Struktur des in Technovit eingebetteten Lungenparenchyms in TG und in KG. Regelmäßig wurden Erhebungen der dunkelblau markierten AE1-Zellkerne nach intraalveolär erkannt. Ebenso wurden den AE1-Zellen angrenzend einige zumeist plump-beerenförmige Zellen mit heterogener und z.T. vakuolärer Struktur gesehen. Hierbei handelte es sich entweder um Alveolarmakrophagen oder um AE2-Zellen. Definitiv ließ sich bei der hier gewählten Vergrößerung nicht im Einzelfall klären, um welchen der beiden Zelltypen es sich handelte. Generell kann jedoch gesagt werden, dass die tief alveolär gelegenen und eng an die AE1-Zellen angrenzenden Zellen mit hellen Vakuolen eher als AE2-Zellen zu

werten waren. Umgeben waren die Alveolen von einem dichten Netz aus von Endothelzellen ausgekleideten Kapillaren, die z.T. mit Erythrozyten und weiteren zellulären Bestandteilen des Blutes gefüllt waren. Es lagen keine Anzeichen für die Entwicklung einer einem Emphysem ähnlichen Veränderung der Lungenstruktur vor. Insbesondere war keine Aufweitung der terminalen Luftwege oder eine Veränderung der Alveolengröße im Vergleich zur KG zu beobachten. Teil B der Abb. IV. zeigt zum Vergleich einen Ausschnitt aus KG mit ähnlichen qualitativen Befunden wie in TG. Die Verteilung der Alveolen und Kapillaren sowie der darin befindlichen Zellen ließen augenscheinlich eine regelhafte Entwicklung des Lungenparenchyms erkennen, welches keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen erkennen ließ. Ebenso schien die Dicke der Inter-alveolar-septen in beiden Gruppen gleich stark ausgeprägt (Abb. IV).

Bei der Betrachtung der in Epon eingebetteten Semidünnschnitte der Trachea fielen ebenfalls qualitativ keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf. In beiden Gruppen wurde die adluminale Ausrichtung der Trachea beginnend mit dem Trachealepithel, dem daran angrenzenden subepitheliale Binde-gewebe und einer daran abluminal angrenzenden hufeisenförmigen Knorpelspange aus hyalinem Knorpel beobachtet. Diese stellte sich nach ventral geschlossen durchgängig und nach dorsal verjüngend und geöffnet dar. Beide dorsalen Enden der Knorpelspange waren jeweils durch glatte Muskulatur miteinander verbunden. Bei der Betrachtung der einzelnen Wandschichten war eine in beiden Gruppen gleich starke, kontinuierliche Ausbildung des Trachealepithels zu beobachten, welches sich jeweils nach dorsal etwas kräftiger darstellte als ventral. Die Begutachtung des hyalinen Knorpels erweckte den subjektiven Eindruck einer Reduktion der intrazellulären Lipidspeicher in den Chondrozyten, welche sich histologisch als demarkierte ovale Areale darstellten. Binde-gewebe und glatte Muskulatur ließen quantitativ und qualitativ in beiden Gruppen keine gruppenspezifischen Veränderungen bzw. Unterschiede erkennen.

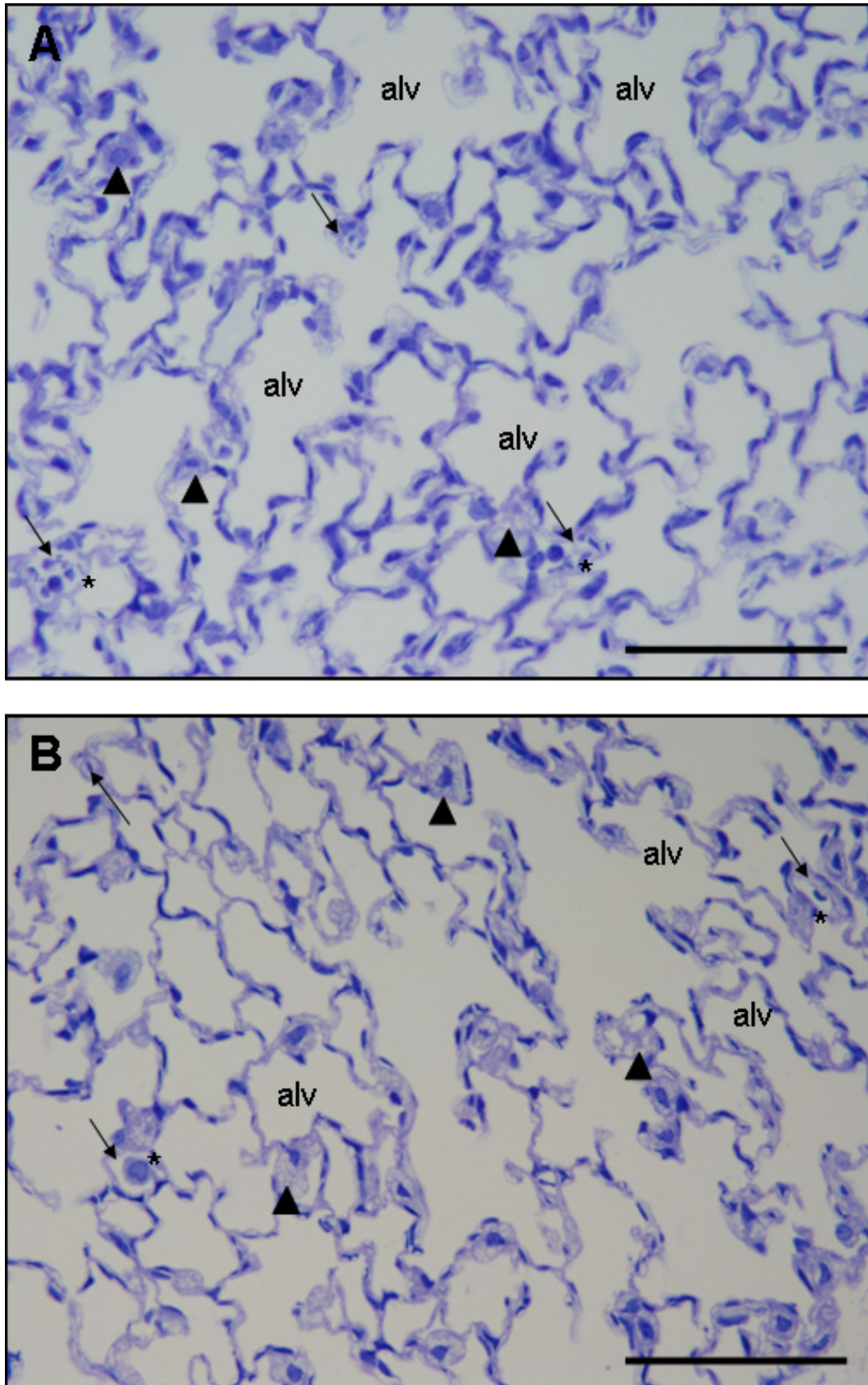


Abb. IV: Vergleichende lichtmikroskopische Darstellung des Lungenparenchyms mit Alveolen und Kapillaren. A: TG und B: KG. Maßstab 180 μm. alv, Alveole; Pfeilspitze, AE2-Zellen; Pfeil, Kapillare; *, Interalveolarseptum. In A waren keine Anzeichen pathologischer Veränderung, die für die Ausbildung eines Emphysems sprechen könnten, zu erkennen.

III.2.1.2. Immunfluoreszenzmikroskopie

Tracheale Nervenfasern wurden immunhistochemisch mit einem Primärantikörper gegen PGP-9.5 I markiert. Sie erscheinen als gelb markierte Anschnitte in Abb. V im Bereich der glatten Muskelzellen der Trachea, welche sich in selbiger Abbildung grün darstellt. A–C zeigen ein Stück des Trachealrings von einem Tier nach Tumorimplantation, wobei A nur markierte Nervenfasern, B nur die Trachealmuskulatur und C das Overlay beider Strukturen zeigt. Ebenso verhält es sich mit den Abb. D–F, welche Aufnahmen von einem Tier aus der Kontrollgruppe zeigen. Mit Pfeilspitzen wurden einige Nervenfasern sowie mit Pfeilen die Trachealmuskulatur exemplarisch markiert. Das Lumen wurde jeweils mit Lu markiert und stellt sich in A–C unten links und in D–F unten rechts dar. A–C zeigen einen etwas kleineren Ausschnitt der Trachealmuskulatur im Vergleich zu D–F. Auch sind in beiden Gruppen große extratracheale Nervenfasern zu erkennen, welche jedoch sowohl für die qualitative als auch quantitative Bewertung der trachealen Innervation keine weitere Bedeutung hatten. Die markierten Axone sind in beiden Gruppen über die gesamte Länge des Ausschnittes verteilt und demonstrieren exemplarisch die Verteilung der trachealen Nervenfasern im Bereich der glatten Muskulatur. Ein Rückschluss auf etwaige Veränderungen in der Innervationsdichte ist jedoch nicht möglich.

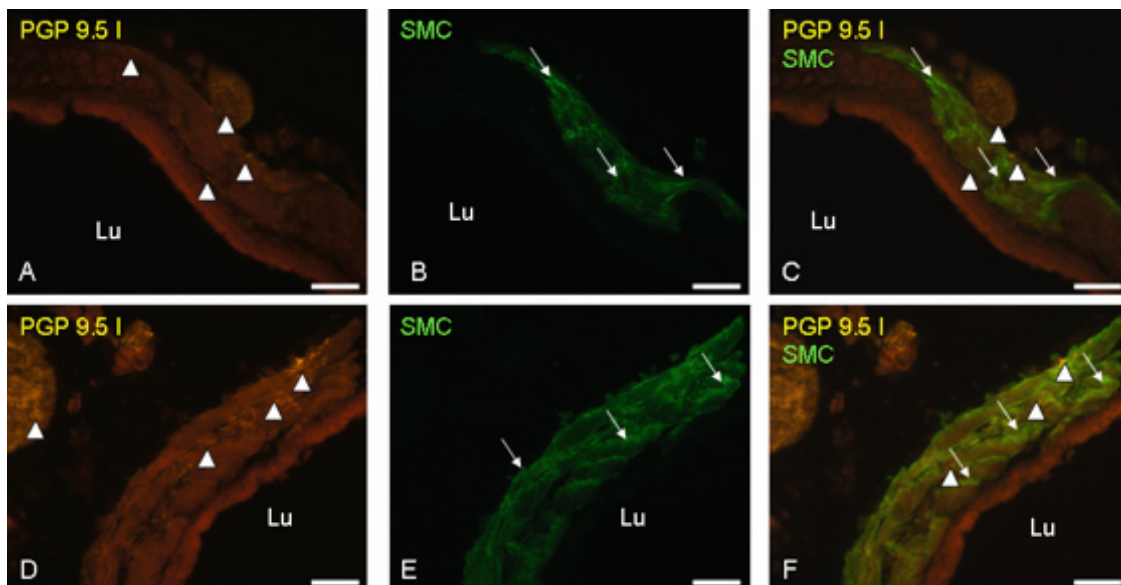


Abb. V: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Innervation der Trachea. Maßstab: 90 μ m. A–C: TG, D–F: KG. A und D: PGP 9.5 I-Immunreaktivität der Nervenfasern in der Trachea, B und E: SMC-Immunreaktivität der glatten Muskulatur in der Trachea. C und F: Überlappung der Immunfluoreszenz aus A und B bzw. D und E. Pfeilspitze: mit PGP 9.5 I markierte Nervenfasern, Pfeile: mit SMC markierte glatte Muskulatur, Lu: Lumen der Trachea.

Die am CLSM aufgenommenen Bilder wurden mit Imaris bearbeitet (Abb. VI). Hierbei wurde die Oberfläche der Strukturen dreidimensional rekonstruiert, um die Verteilung der Nervenfasern im Bereich der glatten Muskulatur besser betrachten zu können. Ein quantitativer Unterschied zwischen den beiden Gruppen war jedoch in dieser Darstellung nicht augenscheinlich. Zu sehen sind in A und B die Oberflächen der grün markierten glatten Trachealmuskulatur, der blau markierten Zellkerne sowie die gelb markierten Nervenfasern. In Abb. A ist in der rechten Bildhälfte ein Nerv zu erkennen (weiße Pfeilspitze), von dem ausgehend einige Nervenfaserausläufer in die Trachea ziehen und markiert wurden. Der bogenförmige Verlauf der glatten Trachealmuskulatur von oben mittig nach unten rechts deutet die Lage des unten links im Bild befindlichen Lumens an. Hieran sind einige der blau markierten Zellkerne des Trachealepithels angrenzend zu erkennen. In Abb. B war wie in A der Verlauf der gelb markierten Nervenfasern zwischen der glatten Trachealmuskulatur zu beobachten. Das Lumen befand sich hier rechts unten, an welches angrenzend ebenfalls einige der Zellkerne des Trachealepithels blau markiert wurden (Abb. VI).

Die Whole-Mount-Aufnahmen eines ca. 1 mm langen longitudinal zum Lumen aufgetrennten und ausgebreiteten Trachealrings, in dem Nervenfasern mit dem Antikörper PGP 9.5 I markiert wurden, deuteten darauf hin, dass die Innervation der Trachea in der TG, verglichen mit der KG, reduziert ist. Zu sehen ist ein wesentlich geringer ausgeprägtes Geflecht aus Nervenfasern in A und C im Vergleich zu den Stellen B und D, die zur KG gehören. Die Hauptverlaufsrichtung der Nervenfasern zieht sich entlang der Verlaufsrichtung der Trachea. In der Abbildung sind anteilig sowohl in der TG als auch in der KG etwa gleich viele Nervenfasern zu beobachten, die quer zum Lumen verlaufen (Abb. VII).

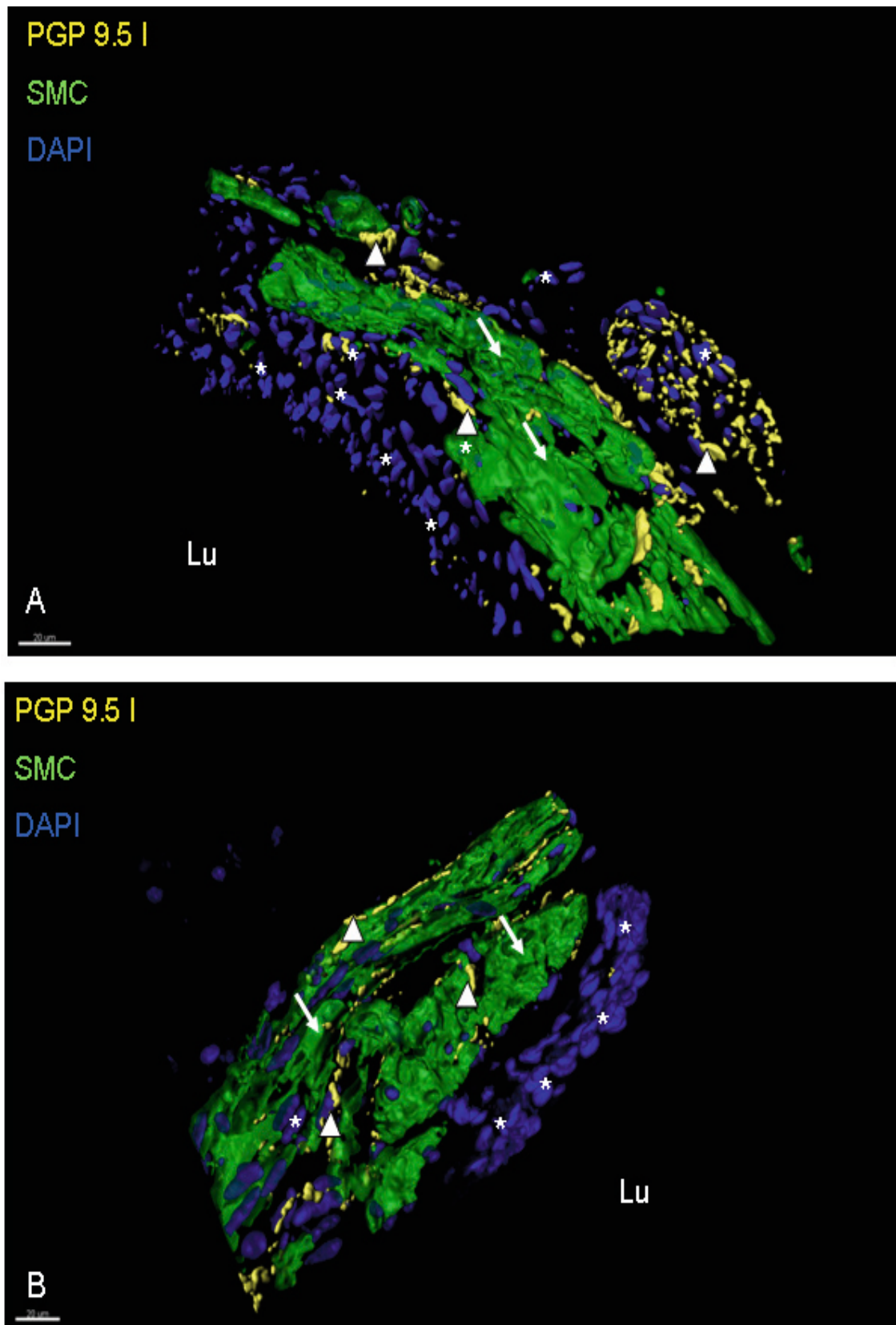


Abb. VI: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Trachea mit 3D-Oberflächenrekonstruktion. Schnittdicke: 30 μm . Maßstab: 20 μm . A: TG, B: KG. Pfeilspitze, PGP 9.5 I-Immunreaktivität der Nervenfasern in der Trachea; Pfeil, SMC-Immunreaktivität der glatten Muskulatur in der Trachea; *, Dapi-Markierung der Nuklei; Lu, Lumen der Trachea.

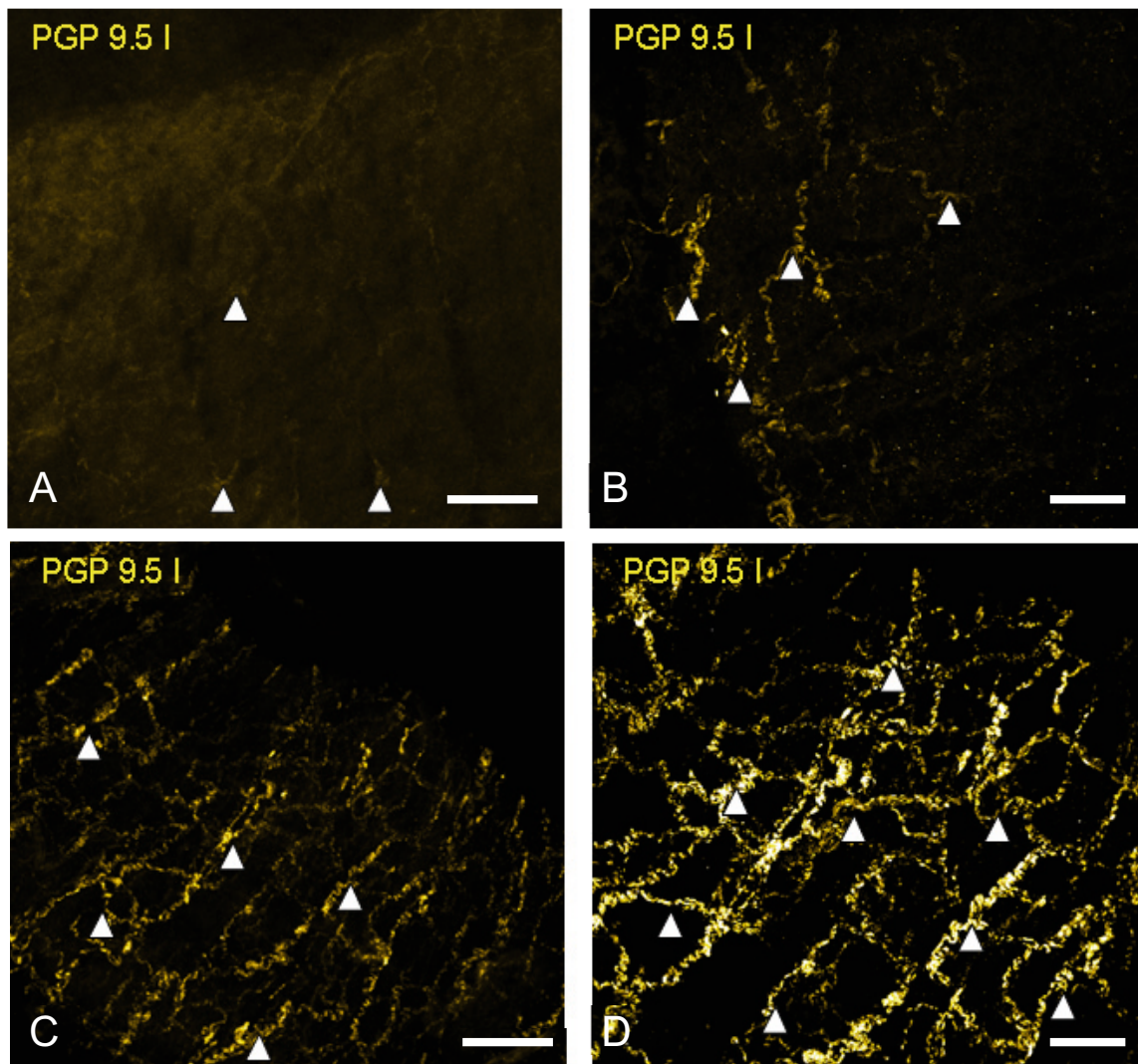


Abb. VII: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Nervenfasern der Trachea an einem Whole-Mount-Präparat. A und C: Maßstab 86 µm, B und D: Maßstab 73 µm. A und B: PGP 9.5 I-Immunoreaktivität der positiven Nervenfasern in TG. C und D: PGP 9.5 I-Immunoreaktivität der positiven Nervenfasern in KG. Pfeilspitze, PGP 9.5 I positive Nervenfasern.

III.2.1.3. Trachealepithel in der Rasterelektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurde die Oberfläche des Trachealepithels beurteilt und zwischen TG und KG verglichen. Dabei fiel auf, dass in TG die Zilien weniger aufrecht standen als in der Kontrollgruppe. Dies führte dazu, dass sie den Eindruck erweckten, sich um die Zelloberfläche der nicht-zilientragenden Zellen zu legen. In KG konnte ein annähernd gleich großer Anteil beider Zelltypen beobachtet werden, die gleichmäßig über das Epithel verteilt waren. Die zilientragenden Zellen zeigten hierbei aufrecht stehende Zilien wie in Abb. VIII.

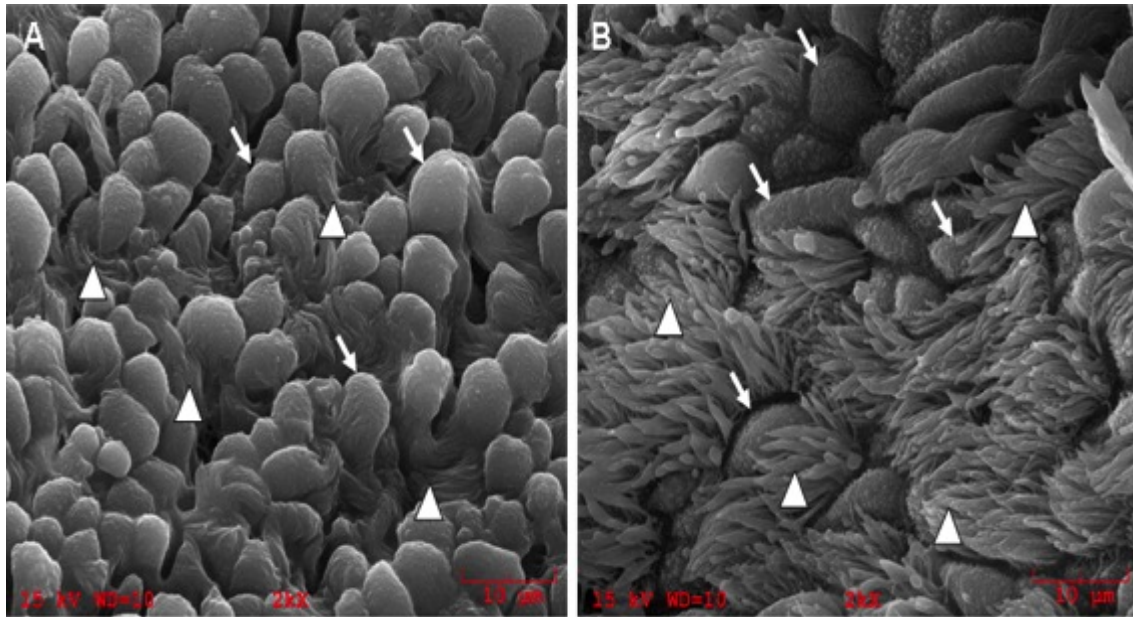


Abb. VIII: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Trachealepithels. A: TG, B: KG, Maßstab 10 µm. Pfeilspitze, zilientragende Zellen; Pfeil, nicht-zilientragende Zellen.

III.2.1.4. Qualitative TEM

Es konnte kein morphologischer Unterschied des Trachealknorpels zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Insbesondere die intrazellulären Lipidspeicher waren in beiden Gruppen gleichermaßen vorhanden und wiesen eine ähnliche Morphologie und Größe auf. Die Ultrastruktur der Extrazellulärmatrix des Trachealknorpels wies ebenfalls zwischen den beiden Gruppen keine morphologischen Unterschiede auf. Während die rasterelektronenmikroskopische Darstellung Auffälligkeiten der zilientragenden Zellen gezeigt hatte, konnte dies in den transmissionselektronenmikroskopischen Schnittpräparaten nicht nachvollzogen werden. Insbesondere schienen sich die Anteile an zilientragenden Zellen und nicht-zilientragenden Zellen im Trachealepithel nicht zu unterscheiden zwischen beiden Gruppen (Abb. IX, Tab. X).

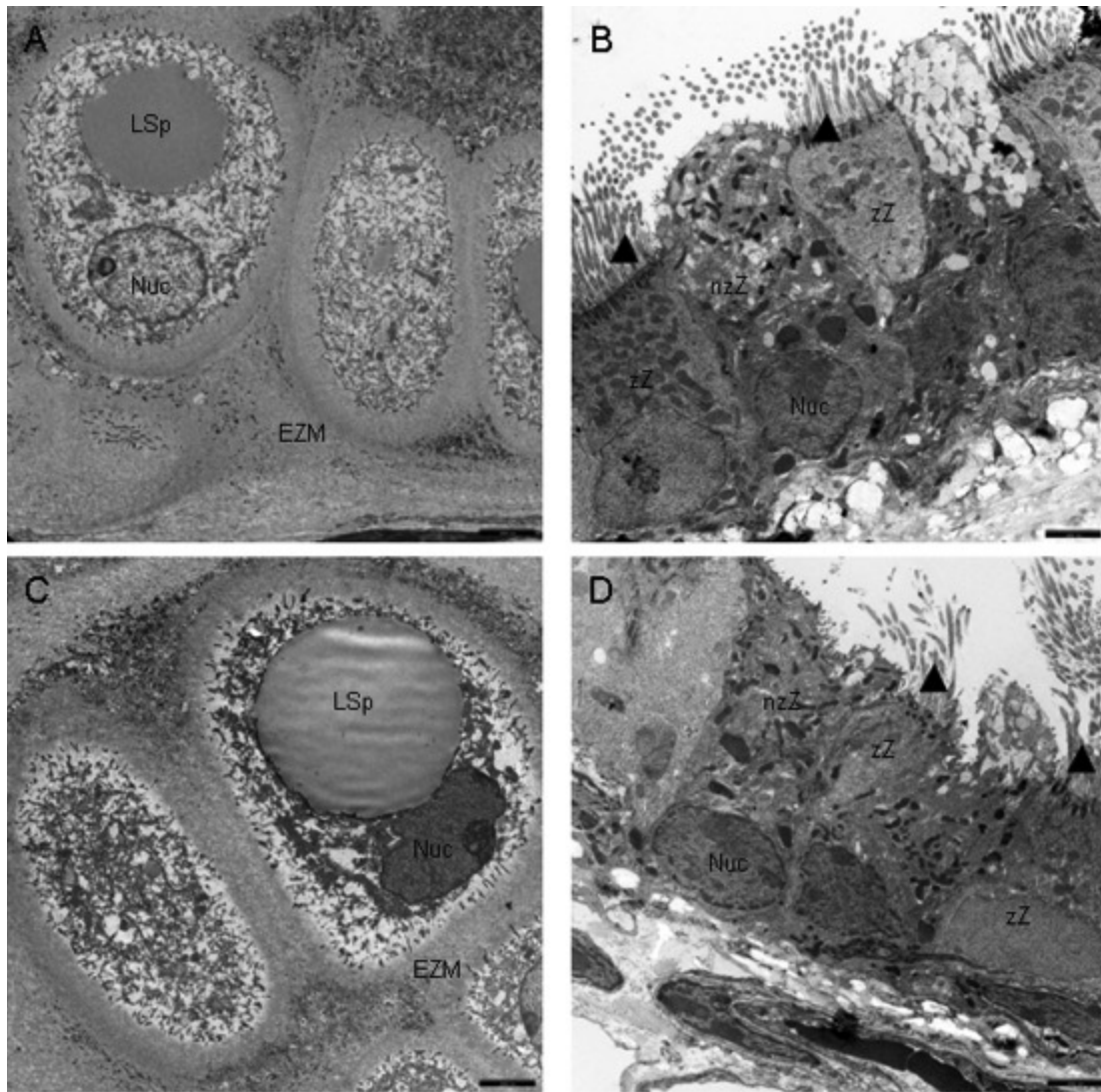


Abb. IX: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Trachealwand: A und B: TG, C und D: KG, A und C: Trachealknorpel, B und D: Trachealepithel. Maßstab: 2,5 μm . Nuc, Nucleus; EZM, Extrazellulärmatrix; LSp, Lipidspeicher der Chondrozyten; zZ: ziliert tragende Zellen; nzZ: nicht-ziliert tragende Zellen; Pfeilspitze, Zilien auf dem Trachealepithel.

III.2.2. Quantitative Mikroskopie bzw. Stereologie

III.2.2.1. Lunge

III.2.2.1.1. Volumen der Gasaustauschregion (Parenchym)

Als globaler Parameter für das Maß an Gewebe, das für den Gasaustausch zur Verfügung steht, wurde dessen Volumen bestimmt. Außerdem dienten diese Daten als Referenzvolumen für weitere Parameter wie z.B. die Alveolaroberfläche. Wie das Lungenvolumen wies auch das Volumen der Gasaustauschregion keine Unterschiede zwischen KG und TG auf (Tab. VIII).

Tab. VIII: Volumen von Lunge und Gasaustauschregion (Parenchym)

Parameter	KG	TG	P-Wert
V(Lunge) [mm ³]	460 ± 44	484 ± 68	0,190
V _V (Parenchym/Lunge)	0,88 ± 0,05	0,86 ± 0,10	0,931
V(Parenchym,Lunge) [mm ³]	407 ± 44	418 ± 70	0,258

Legende: V(Lunge), Lungenvolumen; V_V(Parenchym/Lunge), Volumendichte des Parenchyms bezogen auf das Lungenvolumen; V(Parenchym,Lunge), Volumen des Lungenparenchyms in der Lunge.

III.2.2.1.2. Alveolaroberfläche

Zur Überprüfung der Hypothese, ob die TK zu einer Reduktion der Alveolaroberfläche führt, wurden die in Tab. IX zusammengefassten Daten erhoben. Weder die Oberflächendichte noch die Gesamtalveolaroberfläche ließ einen Unterschied zwischen beiden Gruppen erkennen. Es konnte demnach kein Einfluss der TK auf die Größe der Alveolaroberfläche nachgewiesen werden.

Tab. IX: Oberfläche der Alveolen

Parameter	KG	TG	P-Wert
S _V (Alvepi/Parenchym)	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,931
S(Alvepi,Parenchym) [cm ²]	494 ± 66	517 ± 141	0,863

Legende: S_V(Alvepi/Parenchym), Oberflächendichte des Alveolarepithels bezogen auf Lungenparenchym; S(Alvepi,Parenchym), Gesamtoberfläche des Alveolarepithels der Lunge.

III.2.2.1.3. Alveolarepithelzellen Typ II

Bei der Analyse der AE2-Zellen standen die intrazellulären Surfactantspeicher der Lamellenkörperchen im Vordergrund. Daneben sollten einige weitere zelluläre Kompartimente zur besseren Charakterisierung der AE2-Zellen beurteilt werden. Die LB zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen, ließen jedoch eine Tendenz zu einer Reduktion der intrazellulären Surfactantspeicher bei der TG vermuten. Der Anteil des Zytoplasmas in den AE2-Zellen war bei der TG verringert. Die weiteren intrazellulären Kompartimente ließen keine Unterschiede zwischen TG und KG erkennen. Jedoch zeigte das Gesamtvolumen an im Lungenparenchym enthaltenen AE2-Zellen eine Tendenz zur Reduktion in TG.

Tab. X: Stereologische Daten der Alveolarepithelzellen Typ II

Parameter Abkürzung	KG	TG	P-Wert
$V_V(\text{LB}/\text{AE2})$	$0,30 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,02$	0,113
$V_V(\text{ZP}/\text{AE2})$	$0,48 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,06$	0,077
$V_V(\text{Mito}/\text{AE2})$	$0,10 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,03$	0,796
$V_V(\text{Nuk}/\text{AE2})$	$0,18 \pm 0,04$	$0,18 \pm 0,02$	0,730
$V(\text{AE2}, \text{Parenchym})$ [mm ³]	$7,07 \pm 1,62$	$5,71 \pm 1,18$	0,094
$\bar{v}_N(\text{AE2})$ [μm ³]	614 ± 217	485 ± 96	0,161
$V(\text{LB}, \text{AE2})$ [μm ³]	186 ± 71	132 ± 29	0,094
$V(\text{ZP}, \text{AE2})$ [μm ³]	303 ± 132	207 ± 30	0,024
$V(\text{Mito}, \text{AE2})$ [μm ³]	74 ± 54	57 ± 30	0,546
$V(\text{Nuk}, \text{AE2})$ [μm ³]	122 ± 75	89 ± 26	0,605

Legende: $V_V(\text{AE2}/\text{Parenchym})$, Volumendichte der AE2-Zellen bezogen auf das Lungenparenchym; $V_V(\text{LB}/\text{AE2})$, Volumendichte der LB in den AE2-Zellen; $V_V(\text{ZP}/\text{AE2})$, Volumendichte des Zytoplasmas in den AE2-Zellen; $V_V(\text{Mito}/\text{AE2})$, Volumendichte der Mitochondrien in den AE2-Zellen; $V_V(\text{Nuk}/\text{AE2})$, Volumendichte des Nukleus in den AE2-Zellen; $V(\text{AE2}, \text{Parenchym})$, Gesamtvolumen der im Lungenparenchym enthaltenen AE2-Zellen in mm³; $\bar{v}_N(\text{AE2})$, anzahl-gewichtetes mittleres Volumen der AE2-Zellen in μm³; $V(\text{LB}, \text{AE2})$, Volumen der LB in einer durchschnittlichen AE2-Zelle; $V(\text{ZP}, \text{Parenchym})$, Volumen des Zytoplasmas einer durchschnittlichen AE2-Zelle; $V(\text{Mito}, \text{Parenchym})$, Volumen der Mitochondrien einer durchschnittlichen AE2-Zelle; $V(\text{Nuk}, \text{Parenchym})$, Volumen des Zellkerns einer durchschnittlichen AE2.

III.2.2.1.4. Relation der LB zum Alveolarepithel

Die Anzahl der in der Lunge enthaltenen AE2-Zellen unterschied sich nicht zwischen beiden Gruppen. Jedoch zeigte sich eine ca. 25%-ige Reduktion der AE2-Zellvolumendichte in der TG nach 21 Tagen ($p = 0,001$). Eine etwa ebenso starke Reduktion des in der Lunge enthaltenen Gesamtvolumens intrazellulärer LB ($p < 0,05$) war hiermit verbunden. Für die Alveolaroberfläche bedeutete dies in der TG eine ebenfalls ca. 25%-ige Reduktion der zur Reduktion der Oberflächenspannung verfügbaren intrazellulären Surfactantspeicher (Abb. X).

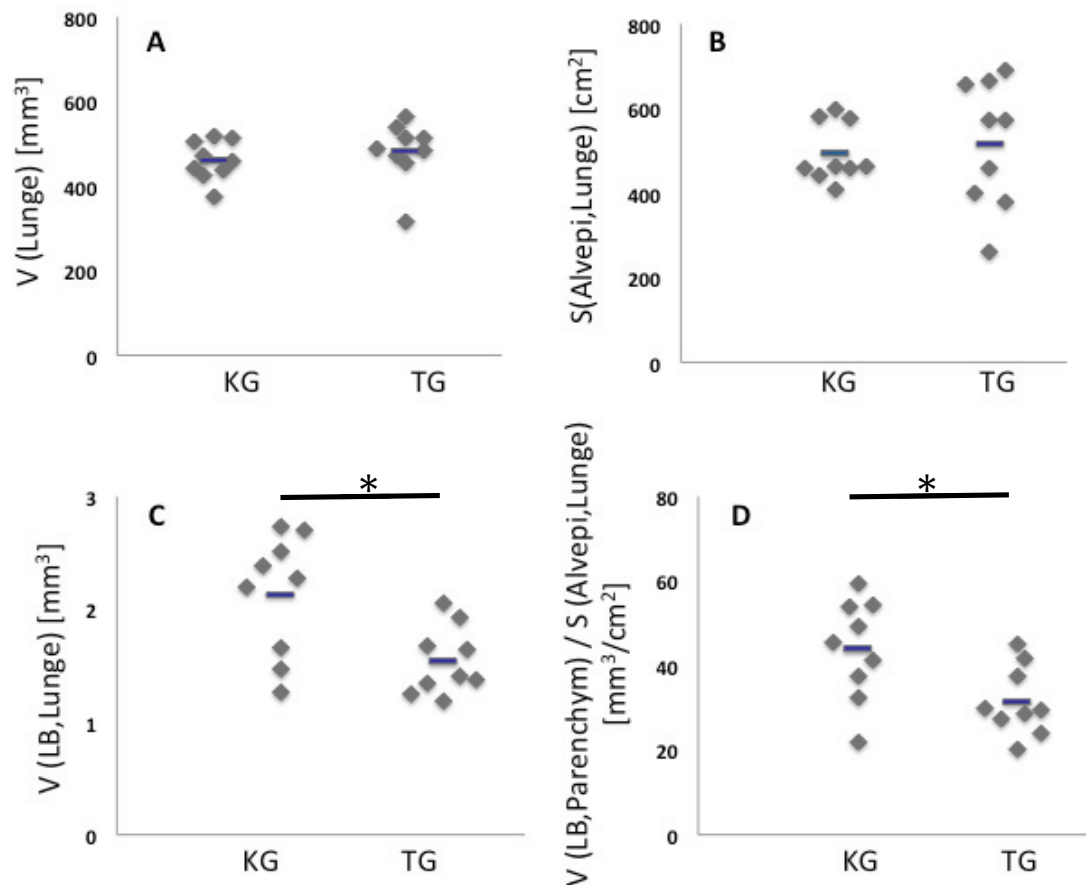


Abb. X: Übersicht der stereologischen Daten zum Surfactantsystem nach 21 Tagen. Punkte, Daten einzelner Tiere; Linien, Mittelwert der jeweiligen Gruppe; KG, Kontrollgruppe; TG, Tumorgruppe. A: Lungenvolumina in KG und TG. B: Alveolaroberfläche der Lunge in KG und TG. C: Volumen der Lamellenkörper in der Lunge D: Volumen der LB bezogen auf die Alveolaroberfläche.

III.2.2.2. Trachea

III.2.2.2.1. Innervation

Um zu klären, ob die Tumorkachexie bei der Trachea zu einer Reduktion der Innervation führt, wie für das Herz beschrieben, wurde die Methode zur stereologischen Quantifizierung der Gesamtlänge der Axone nach Mühlfeld et al. (2010) modifiziert. Die hierbei gewonnenen Daten wurden in Tab. XI zusammengefasst und zwischen beiden Gruppen verglichen.

Es zeigte sich, dass die Axonlänge in der TG mit durchschnittlich 7,27 mm pro μm Trachea im Gegensatz zu der KG mit 14,74 mm pro μm Trachea auf etwa die Hälfte reduziert war. Ebenso waren sowohl die Axonoberfläche als auch das Axonvolumen jeweils in der TG reduziert.

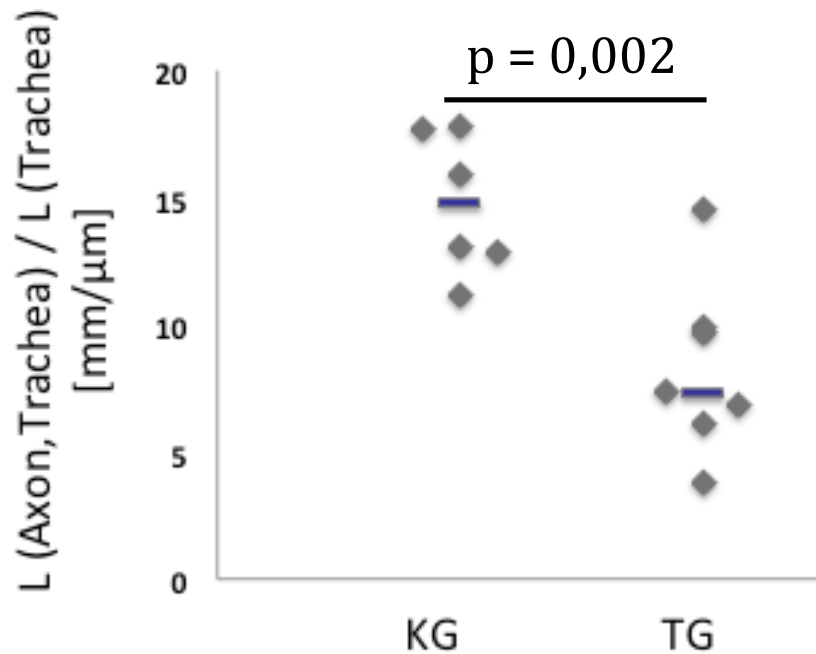


Abb. XI: Axonlänge der in der Trachea enthaltenen Nervenfasern nach 21 Tagen. Die Länge ist auf den μm Trachea berechnet, um Fehlinterpretationen durch unterschiedlich lange Tracheae zu vermeiden.

Tab. XI: Stereologische Daten zur Innervation der Trachea

Parameter Abkürzung	KG	TG	P-Wert
L(Axon,Trachea) [mm/ μm]	14,74 \pm 2,76	7,27 \pm 2,27	0,002
S(Axon,Trachea) [mm ² / μm] $\times 10^3$	19,4 \pm 3,6	10,0 \pm 2,6	0,002
V(Axon,Trachea) [mm ³ / μm] $\times 10^3$	2,1 \pm 0,5	1,1 \pm 0,3	0,002
V _V (Axon/Trachea)	0,007 \pm 0,002	0,004 \pm 0,0006	0,002

Legende: L(Axon,Trachea), Gesamtlänge der Axone; S(Axon,Trachea), Gesamtoberfläche der Axone; V(Axon,Trachea), Gesamtvolumen der Axone; V_V(Axon/Trachea), Volumendichte der Axone.

III.2.2.2.2. Zusammensetzung der Trachealwand

Zur Orientierung über mögliche quantitative morphologische Veränderungen der Zusammensetzung der Trachealwand wurden die Volumina einiger wichtiger Gewebetypen bestimmt. Hierbei lag ein besonderer Schwerpunkt auf der Erhebung von Parametern zum Epithel, der glatten Muskulatur sowie dem hyalinen Knorpel. Die stereologisch gewonnenen Daten wurden in Tab. XII zusammengefasst und zwischen TG und KG verglichen.

Im Gegensatz zu der Innervation wies keiner der anderen Gewebetypen eine Veränderung auf. Insbesondere konnten keine Hinweise auf ein atrophisches

Remodeling des Knorpels, der glatten Muskelzellen oder des Bindegewebes festgestellt werden.

Tab. XII: Stereologische Daten der Trachealwand

Parameter Abkürzung	TG	KG	P-Wert
V _V (Knorpel/Trachea)	0,32 ± 0,06	0,35 ± 0,04	0,945
V _V (Epithel/Trachea)	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,07	0,180
V _V (zZ/Epithel)	0,35 ± 0,05	0,29 ± 0,04	0,240
V _V (nzZ/Epithel)	0,64 ± 0,05	0,70 ± 0,04	0,240
V _V (BGW/Trachea)	0,30 ± 0,04	0,33 ± 0,04	0,310
V _V (SMC/Trachea)	0,17 ± 0,03	0,13 ± 0,05	0,132
V _V (Chondro/Knorpel)	0,40 ± 0,06	0,40 ± 0,04	0,937
V _V (Lipid/Chondro)	0,28 ± 0,10	0,38 ± 0,09	0,180
V(Knorpel,Trachea) [μm ³ /μm]*10 ⁶	88,98 ± 32,38	102,28 ± 35,95	0,394
V(Epithel,Trachea) [μm ³ /μm]*10 ⁶	49,71 ± 15,40	44,96 ± 6,20	0,394
V(zZ,Trachea) [μm ³ /μm]	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,818
V(nzZ,Trachea) [μm ³ /μm]	0,22 ± 0,08	0,29 ± 0,04	0,132
V(BGW,Trachea) [μm ³ /μm]*10 ⁶	79,16 ± 27,73	97,53 ± 34,63	0,310
V(SMC,Trachea) [μm ³ /μm]*10 ⁶	46,23 ± 16,93	38,95 ± 15,23	0,485
V(Chondro, Trachea) [mm ³ /cm]	0,36 ± 0,15	0,40 ± 0,13	0,699
V(Lipid,Chondro) [mm ³ /cm]	0,10 ± 0,06	0,15 ± 0,04	0,310

Legende: V_V(Knorpel): Volumendichte des Knorpels in der Trachea; V_V(Epithel), Volumendichte des Epithels in der Trachea; V_V(zZ), Volumendichte der zilientragenden Zellen im Trachealepithel; V_V(nzZ), Volumendichte der nicht-zilientragenden Zellen im Trachealepithel; V_V(BGW), Volumendichte des Bindegewebes in der Trachea; V_V(SMC), Volumendichte der glatten Muskulatur in der Trachea; V_V(Chondro/Knorpel), Volumendichte der Chondrozyten im hyalinen Knorpel; V_V(Lipid/Chondro), Volumendichte der in den Chondrozyten eingelagerten Lipidspeicher; V(Knorpel,Trachea), Volumen des Knorpels in der Trachea; V(Epithel,Trachea), Volumen des Epithels in der Trachea; V(zZ,Trachea), Volumen der zilientragenden Zellen in der Trachea; V(nzZ), Volumen der nicht-zilientragenden Zellen in der Trachea; V(BGW,Trachea), Volumen des Bindegewebes in der Trachea; V(SMC,Trachea), Volumen der glatten Muskulatur in der Trachea; V(Chondro,Trachea), Volumen der Chondrozyten in der Trachea; V(Lipid/Chondro), Volumen der in den Chondrozyten eingelagerten Lipidspeicher.

III.4. Differentielle Zentrifugation der BAL zur Surfactant-Bestimmung

Der Quotient aus LA, dem aktiven Surfactant, und SA, dem inaktiven Surfactant in der differentiellen Zentrifugation der BAL-Flüssigkeit, zeigte keinen Unterschied zwischen TG ($0,61 \pm 0,09$) und KG ($0,60 \pm 0,17$).

IV. Diskussion

IV.1. Verwendete Methoden

IV.1.1. Experimentaufbau, Probenentnahme und Fixierung

Sämtliche der in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden von 8–9 Wochen alten weiblichen C57Bl6/J Mäusen gewonnen. Das Alter der verwendeten Mäuse spiegelt einen Zeitpunkt der menschlichen Entwicklung wider, bei dem die Entwicklung der Lunge weitgehend abgeschlossen ist (Copland und Post 2004, Amy et al. 1977). Die Tiere wurden bei einem wechselweise 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus gehalten und mit einer standardisierten Labortiernahrung (4,5% w/w Fettanteil) gefüttert. Die Nahrungsaufnahme wurde während des Experimentes beobachtet, und es konnte keine Anorexie festgestellt werden. Dies entspricht dem Versuchsaufbau von Mühlfeld et al. (2011) und Das et al. (2011), bei dem eine vergleichbare Reduktion des Körpergewichtes erreicht wurde. Die Entscheidung, Weibchen für das Experiment zu verwenden, beruht auf der besseren Sozialverträglichkeit weiblicher Mäuse und der Vermeidung durch Rangordnungskämpfe entstehender Stressfaktoren. Der C57Bl6/J Maus-Stamm ist einer der am häufigsten in Tierversuchen verwendeten Mausstämme und lässt sich deshalb gut mit anderen Studien vergleichen. Insbesondere die Arbeit von Bishai und Mitzner (2008), die die Lunge bei Kalorienreduktion und einer Reduktion des Körpergewichtes um 40% untersuchten, kann daher mit den in dieser Arbeit erlangten Erkenntnissen gut verglichen werden.

Die subkutane Tumorumplantation von LLC-Zellen stellt eine Standardmethode zur Erzeugung eines Tumorkachexie-Modells dar und wurde in verschiedenen Arbeiten erfolgreich verwendet (Lovera et al. 1998, Togni et al. 2003, Sherry et al. 1989). LLC-Zellen stammen aus einer zu C57Bl/6-Mäusen syngen Zellreihe. Dies ist abzugrenzen von xenogenen Modellen, in denen die Zellreihe einer anderen Spezies entstammt als der Spezies, der die Zellen implantiert werden. Das Immunsystem der Empfängertiere kann bei Implantation syngener Zellen intakt bleiben und muss nicht unterdrückt werden. LLC-Zellen gehören zur Gruppe der Lungentumore, bei denen zunächst zwischen kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungentumoren unterschieden wird. Letztere werden unterteilt in großzellige Tumore, Plattenepithel-Tumore und das dem kleinen Alveolarepithel entstammende Adenokarzinom (Ho et al. 2015). Nach subkutaner Implantation entwickeln Mäuse innerhalb von zwei Wochen eine

ausgeprägte Tumorkachexie, wobei der Tumor ca. 6% des Körpergewichtes ausmacht (Lovera et al. 1998, Togni et al. 2003). Das relative Tumorgewicht in Bezug auf das Körpergewicht machte in dieser Arbeit etwa 10–15% aus, wurde jedoch nach drei Wochen gemessen und spricht somit für einen weiter fortgeschrittenen Prozess der Tumorkachexie. Ein schneller und rapider Verlust an Körpergewicht und Fettgewebe konnte durch Sherry et al. (1989) ebenfalls gezeigt werden. Im Vergleich zu Lovera et al. (1998) und Togni et al. (2003) war eine Anorexie der Mäuse, wie diese nach 15 Tagen beschrieben wurde, in dieser Arbeit nicht zu beobachten.

Die Art des hier beschriebenen Gewichtsverlustes ohne Anorexie durch Abbau der Skelettmuskulatur und des braunen sowie weißen Fettgewebes (Busquets et al. 2004, Bennani-Baiti und Walsh 2005) wird u.a. auf erhöhte TNF- α -Werte zurückgeführt (Lovera et al. 1998). TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin und wird sowohl von Tumorzellen als auch von Immunzellen produziert. Die im selben Versuchsaufbau beschriebene Hypoinnervation des linksventrikulären Myokards wurde durch Mühlfeld et al. (2011) u.a. mit den erhöhten TNF- α -Serumwerten (TG: 28.11 ± 1.92 pg/ml; KG: 13.02 ± 4.12 pg/ml) in Verbindung gebracht. Aber auch in der Arbeit von Tolosa et al. (2005) wird eine gesteigerte Apoptoserate der Skelettmuskulatur durch TNF- α erklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollten systemisch wirksam werdende Prozesse und deren Auswirkung auf Lunge und Trachea betrachtet werden, weshalb die subkutane Injektion der Tumorzellen gewählt wurde und nicht eine Injektion der Zellen in die Lunge oder Trachea. Dies hätte z.B. durch direkte Raumforderung oder angioproliferative Prozesse des Tumors und eine hierdurch auftretende Minderperfusion oder Ventilation das Ergebnis der Arbeit dahingehend beeinflussen können, dass nicht die systemische Tumorkachexie betrachtet worden wäre, sondern die Auswirkungen eines Lungentumors auf die direkte Umgebung seines Entstehungsortes.

Um die Tumorzellen implantieren zu können, wurden diese in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit einem hohen Glukosegehalt und 10% (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin gezüchtet. Dieses Medium enthält Nährstoffe wie Salze, Aminosäuren und Vitamine, die für das Überleben der Zellen nötig sind, und schützt die Kultur durch die Antibiose vor Infektionen. Glutamin als Regulator der DNA-Replikation wurde dem Medium hinzugegeben, um ein exponentielles Wachstum der Zellen gewährleisten zu können (Zetterberg und Enström 1981). Die Anzahl von 2×10^6 Zellen wurde gewählt, da dies die Erzeugung einer

manifesten Tumorkachexie innerhalb von 21 Tagen bei Mäusen gewährleistet, jedoch das vorzeitige Versterben der Tiere vermeidet (Mühlfeld et al. 2011, Das et al. 2011).

Die Mäuse wurden nach 21 Tagen durch eine hohe Dosis des inhalativen Narkotikums Isofluran anästhesiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Für die weitere Bearbeitung wurden die Proben entweder für die Immunhistochemie sowie die Licht- und Elektronenmikroskopie in 4% PFA in PBS fixiert und anschließend für die Elektronenmikroskopie mindestens 24 Stunden in 1,5% Glutaraldehyd, 1,5% Paraformaldehyd in 0,15 M Hepes-Puffer zum besseren Erhalt der Ultrastruktur nachfixiert (Mühlfeld et al. 2007) oder für die Bearbeitung mit der qRT-PCR in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren. Man kann zwischen der chemischen und physikalischen Fixierung des Gewebes unterscheiden. Beide Methoden erzeugen Artefakte und sind somit für bestimmte Methoden besser, für andere schlechter geeignet. Eine sorgfältige Auswahl der Fixierung ist abhängig von der Fragestellung zu treffen. Die physikalische Fixierung von kleinen Lungenstückchen ist für die stereologische Analyse nicht geeignet, da für die Stereologie das gesamte Referenzvolumen benötigt wird. Daher wurde die chemische Fixierung des Gewebes zur licht- und elektronenmikroskopischen Beurteilung verwendet, bei der zwei Methoden möglich sind, die beide Vor- und Nachteile haben. Grundsätzlich unterscheidet man bei der Lunge die Instillationsfixierung von der Perfusionsfixierung. Bei der Instillationsfixierung wird die Trachea kanüliert, die Lunge durch Eröffnung der Pleurahöhle zum Kollaps gebracht und das Fixans bei konstantem hydrostatischen Druck in die Lunge instilliert. Bei der Perfusionsfixierung wird die geblähte Lunge über das Blutgefäßsystem mit dem Fixans perfundiert, was eine sehr schnelle Fixierung erlaubt und im besten Fall die Strukturen des Alveolarraums in situ fixiert. Grundsätzlich sind beide Methoden zur Fixierung der Lunge geeignet (Ochs 2005, Mühlfeld et al. 2007). Die Perfusionsfixierung stellt gerade bei Fragestellungen in Bezug auf intra-alveolär gelegene Strukturen oder bei Immunogold-Markierungen die Methode der Wahl dar, kann jedoch durch einen zu großen Druck, der beim Einbringen des Fixans in das Gefäßsystem entsteht, Schaden an der Blutluftschranke der Lunge verursachen, das Gefäßsystem in Arealen aufweiten, in denen diese eine geringere Perfusion aufweisen und somit Artefakte bei der Beurteilung des Gewebes erzeugen. Da die Vorteile der Perfusionsfixierung für die hier bearbeiteten Fragestellungen irrelevant waren, wurde der weniger artefaktanfälligen und einfacher durchzuführenden Instillationsfixierung der Vorzug gegeben.

Die Entscheidung, Formaldehyd und Glutaraldehyd als Fixierungsmittel zu verwenden, beruht auf guten Erfahrungen bei der Mikroskopie, in der sie separat oder in Kombination wegen ihrer guten Strukturhaltung und wegen ihres schnellen Eindringens benutzt werden. Die rasche Vorfixierung in 4% PFA ermöglichte eine gute Strukturhaltung für die Lichtmikroskopie, die Verwendung immunhistochemischer Methoden durch Erhalt der Antigenität und bei Nachfixierung mit Glutaraldehyd eine akzeptable Erhaltung der Ultrastruktur in der Elektronenmikroskopie. Bei der Kombination von PFA und GDA für die Nachfixierung der Proben für die Elektronenmikroskopie kann durch den schnell eindringenden Formaldehyd und den etwas langsamer eindringenden Glutaraldehyd eine schnelle, aber auch andauernde Fixierung gesichert werden. Hierbei wurden die von Mühlfeld et al. (2007) empfohlenen Konzentrationen von 1,5% Glutaraldehyd und 1,5% Formaldehyd in Hepes-Puffer benutzt. Dies stellt gerade für die Elektronenmikroskopie eine sehr gute Kombination aus schneller Fixierung, Pufferung des pH-Wertes, eine die Probe vor Flüssigkeitsverschiebungen schützende Osmolarität und einen optimalen Strukturerhalt dar. Entscheidend für die Wahl des Hepes-Puffers an Stelle des Phosphatpuffers ist seine geringere Lipidextraktionsfähigkeit, was gerade bei der Beurteilung des Volumens der LB mit über 90% Phospholipiden einen entscheidenden Vorteil darstellt (Griffiths 1993). Die Nachfixierung der ca. 1 mm³ großen Lungenblöckchen erfolgte mit dem Schwermetall Osmium, was durch Streuung von Elektronen eine bessere Kontrastgebung bei der Elektronenmikroskopie ermöglicht.

Für die Entnahme der BAL wurden die Tiere für 2–3 Minuten in Isofluran narkotisiert und anschließend durch Inzision der Aorta getötet. Dies stellte zum einen den Tod der Tiere sicher, ermöglichte jedoch im Gegensatz zur Instillationsfixierung die Entnahme der BAL-Flüssigkeit sowie der Proben für die quantitative RT-PCR am nicht fixierten Gewebe. Das schnelle Einfrieren der entnommenen Proben in flüssigem Stickstoff stoppt alle metabolischen Prozesse und den Zerfall der mRNA und ermöglicht die weitere Bearbeitung zu einem späteren Zeitpunkt.

IV.1.2. Stereologie

Die Stereologie ermöglicht es, einen dreidimensionalen Raum anhand zweidimensionaler Schnitte quantitativ zu beurteilen. Hierbei handelt es sich um eine Methode, die durch „Random Sampling“, also die randomisierte Auswahl verschiedener Regionen des gesamten Referenzvolumens, gewährleistet, dass die betrachteten Schnitte repräsentativ für das gesamte Referenzvolumen sind (Mayhew 1991). Diese Form des Samplings kommt immer dann zum Einsatz, wenn die Menge des Untersuchungsmaterials sich verkleinert, also zum Beispiel bei der Wahl der Proben für die Einbettung, beim Schneiden der Proben und bei der Wahl der Testfelder am Mikroskop. Das Sampling gewährleistet also, dass der untersuchte Schnitt zufällig jedem Teil des gesamten Organs entstammen kann und dadurch ein repräsentativer Vertreter der Gesamtprobe ist (Hyde et al. 2006). Durch die einem Schnittpräparat inhärente Reduktion der Dimensionalität jeder Objekteigenschaft um eine Dimension ist es erforderlich, dass geeignete Testsysteme verwendet werden, die es gewissermaßen ermöglichen, die fehlende Dimension zurückzugewinnen.

IV.1.2.1. Sampling

Immer dann, wenn der betrachtete Teil des Organs reduziert wurde, wurde in dieser Arbeit ein zufälliges Sampling verwendet. Hierbei besteht die Möglichkeit, die Auswahl durch unabhängige Stichproben (independent uniform random sampling) zu treffen, was den Nachteil hat, dass durch Zufall zwei oder mehr gewählte Objekte (z.B. Probenblöckchen, Testfelder) in unmittelbarer Nähe zueinander liegen (Mayhew 1991). In dieser Arbeit wurde dem sogenannten „systematic uniform random sampling“ (SURS) (Gundersen und Jensen 1987) der Vorzug gegeben, bei dem das erste Item zufällig gewählt wird und alle weiteren sich dann durch eine vordefinierte Schrittweite ergeben. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass ausgehend von dem ersten Zufallsereignis alle weiteren abhängigen Zufallsereignisse sich homogen über den Referenzraum verteilen. Dies erhöht die Effizienz des Samplings, also den notwendigen Aufwand, um eine bestimmte Präzision zu erreichen, enorm (Gundersen und Jensen 1987).

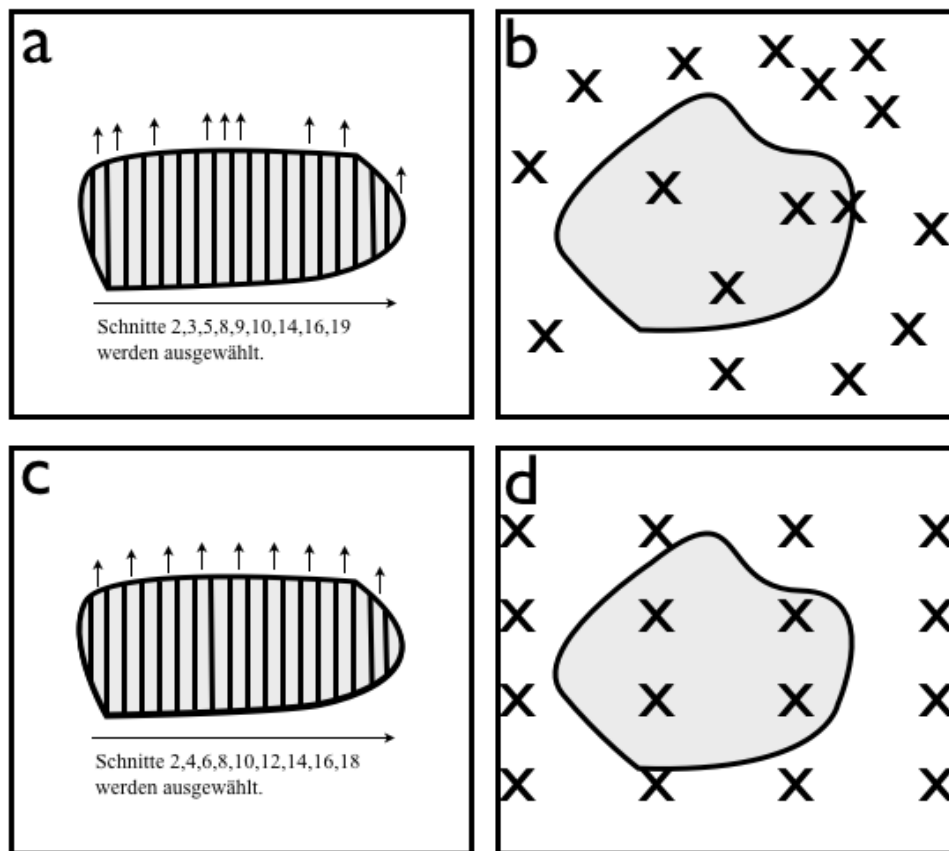


Abb. XII: Vergleich stereologischer Samplingsysteme. a und b: Independent uniform random sampling. Die gewählten Proben (durch Pfeile (a) bzw. Kreuze (b) markiert) werden durch zufällige Auswahl getroffen, wobei jede Position unabhängig von den anderen erzeugt wird. c und d: Systematic uniform random sampling. Ausgehend von der ersten zufällig gewählten Probe werden alle weiteren Proben systematisch über das gesamte Organ verteilt, d.h., die nachfolgenden Positionen ergeben sich aus der Zufälligkeit des ersten gewählten Objekts und der vordefinierten Schrittgröße.

IV.1.2.2. Referenzvolumina

Da die Primärergebnisse von nur wenigen Schnitten pro Tier gewonnen werden, sind diese zunächst nur als relative Werte bezogen auf eine Einheit des Referenzvolumens verfügbar, was eine sinnvolle Interpretation dieser Daten nicht möglich macht. Unterschiede dieser Dichten zwischen Versuchsgruppen können sowohl auf Unterschieden im Zähler (quantifizierte Struktur selbst) als auch im Nenner (Referenzvolumen) beruhen. Es ist daher erforderlich, die Daten mit dem entsprechenden Referenzvolumen zu multiplizieren, um dadurch den absoluten Wert zu erhalten, z.B. die Gesamtzahl der AE2-Zellen in der Lunge statt der Anzahl von AE2-Zellen pro mm^3 Lungenparenchym (Weibel et al. 1966). Zu diesem Zweck muss zu

Beginn das Referenzvolumen bestimmt werden. Es gibt zwei anerkannte Methoden, um das Volumen der fixierten Lunge zu bestimmen: Die erste Methode, die zur Bestimmung des Lungenvolumens verwendet wurde, beruht auf der Verdrängung von Wasser, bei dem die Lunge unabhängig von ihrem Gewicht bzw. ihrer Dichte und damit Ausschaltung des Auf- oder Abtriebs in Bezug zum Wasser unter der Wasseroberfläche gehalten wird. Die Differenz zwischen dem Gewicht des Wassers vor Einbringen der Lunge und während des Einbringens der Lunge entspricht dem Gewicht des verdrängten Wassers mit einer Dichte von ca. 1 g x cm^{-3} . Das Volumen des verdrängten Wassers entspricht somit dem Volumen der Lunge (Scherle 1970). Die Schwäche dieser Methode liegt vor allem in Ungenauigkeiten der Messung, wenn sehr kleine Organe untersucht werden, da anhaftende Flüssigkeitsreste hier zu einer nicht unerheblichen Verfälschung führen können. Daher wurde die Lunge zu Beginn sorgfältig von anhaftender Flüssigkeit befreit. Zudem wurde darauf geachtet, dass die Pinzettenspitze, mit der die Lunge untergetaucht wurde, immer gleich tief in das Wasser ragte und dieser Anteil der Verdrängung durch adäquate Tarierung der Waage keinen Eingang in den für das Lungenvolumen bestimmten Wert hatte. Die zweite Methode zur Bestimmung des Referenzvolumens wurde bei der Trachea angewandt. Es handelt sich hierbei um die Cavalieri-Methode, die beschreibt, dass durch die Auswertung paralleler Schnitte mit einer bekannten, konstanten Schnittdicke und die anschließende Projektion eines Punkterasters mit einer bekannten Fläche pro Punkt auf die Schnitte durch Multiplikation der Punkte, der Fläche pro Punkt, der Dicke pro Schnitt und der Gesamtdicke aller Schnitte das Gesamtvolumen des Objektes bestimmt werden kann (vgl. Abb. XII c) und d)) (Michel und Cruz-Orive 1988). Da die Länge der Trachea und damit das Gesamtvolumen aber erheblichen präparationsbedingten und damit nicht biologisch zu wertenden Schwankungen unterworfen war, wurden die erhobenen Werte jeweils auf 1 mm Länge der Trachea bezogen. Es wurde hier davon ausgegangen, dass die Länge der Trachea nicht wesentlich durch das Experiment verändert wird und dadurch die Angabe eines relativen Wertes gerechtfertigt werden kann.

IV.1.2.3. Testsysteme der Stereologie

Die Reduktion des Raumes auf eine Schnittfläche bedeutet darüber hinaus, dass die darin enthaltenen Strukturen ebenfalls „nur“ innerhalb dieser Fläche abgebildet werden können und hierdurch einen Teil ihrer räumlichen Charakteristik verlieren. Jedes geometrische Objekt im dreidimensionalen Raum verliert durch die Reduktion auf einen

zweidimensionalen Schnitt eine Dimension. Daraus folgt, dass Volumina durch Flächen, Flächen durch Linien, Längen durch Punkte (Anschnitte) in einem Schnitt repräsentiert sind. Der nulldimensionale Parameter „Anzahl“ ist demnach nicht innerhalb eines zweidimensionalen Schnittes repräsentiert (vgl. Tab. XIII) (Weibel et al. 1966).

Tab. XIII: Objekte im Raum, deren Repräsentation im Schnittpräparat und stereologische Testsysteme

Objekt im Raum		Repräsentation des Objekts		Testsystem		Dimension in der Probe	
Objekt	Dimension	Repräsentation	Dimension	Testsystem	Dimension	Name	Dimension
Volumen	3	Flächen	2	Punkte	0	Volumen V_V	$L^3/L^3=L^0$
Fläche	2	Linien	1	Linien	1	Fläche S_V	$L^2/L^3=L^{-1}$
Länge	1	Punkte	0	Flächen	2	Länge L_V	$L^1/L^3=L^{-2}$
Anzahl	0	N.A.	N.A.	Volumen	3	Anzahl N_V	$L^0/L^3=L^{-3}$

Durch mathematische Rückgewinnung der verlorenen Dimension mit Hilfe des passenden stereologischen Messinstrumentes kann diese quantifiziert werden. Dies gelingt, indem ein Raster aus Punkten, Linien oder Flächen bekannter Größe auf den Schnitt projiziert wird. Hierbei gilt, dass die Summe der Dimensionen des untersuchten Parameters und des Testsystems drei oder mehr ergeben müssen. Tab. XIII zeigt wie Objekte in der Fläche abgebildet werden. Ein Volumen, welches als Fläche betrachtet wird, kann demnach durch ein Punkteraster bestimmt werden, indem die Volumendichte des Objekts pro Referenzvolumen bestimmt wird. Für die Bestimmung der Anzahl eines Objekts wird ein dreidimensionales Testsystem, also ein Testvolumen benötigt. Dies wird durch zwei physikalische (physical disector) oder optische Schnitte (optical disector) erzeugt, und Strukturen, die innerhalb des Volumens zwischen den Schnitten liegen, werden gezählt (Sterio 1984). Mit Hilfe lokaler stereologischer Methoden lassen sich darüber hinaus die Volumina einzelner Strukturen (in dieser Arbeit: Rotator-Methode für AE2-Zellen) bestimmen, wobei die Auswahl der Objekte, die untersucht werden, durch den Disector erfolgen muss, damit die Strukturen anzahl-gewichtet gewählt werden und aus den Einzelmessungen das arithmetische Mittel bestimmt werden kann (Vedel-Jensen und Gundersen 1993).

IV.1.2.4. Orientierung des Gewebes

Die Bestimmung von Flächen und Längen ist im Unterschied zu Volumen und Anzahl abhängig von der Orientierung/Ausrichtung der Strukturen im Raum. Daher ist es erforderlich, dass jede Orientierung des Raumes die gleiche Wahrscheinlichkeit hat, in die Analyse einbezogen zu werden (Hyde et al. 2006). Um dies zu gewährleisten, kann die Orientierung der Proben im Ganzen randomisiert werden. Hierzu stehen die Methoden des „orientators“ (Mattfeld et al. 1990) und des „isectors“ (Nyengaard und Gundersen 1992) zur Verfügung. Hierbei wird jedoch die Betrachtung von Organen wie der Trachea erheblich erschwert, da u. U. Strukturen nicht mehr eindeutig einer Lokalisation zugeordnet werden können. Eine Alternative stellt die Verwendung von sogenannten „vertical sections“ (Baddeley et al. 1986) dar. Das Prinzip dieser Methodik besteht in einer Randomisierung der Probe in zwei Dimensionen, während die dritte durch ein spezielles Testsystem randomisiert werden kann. In dieser Arbeit wurden die Lungenproben nicht hinsichtlich ihrer Orientierung randomisiert, da allgemein anerkannt ist, dass die Oberfläche der Alveolarregion der Lunge isotrop im dreidimensionalen Raum ist (Hsia et al. 2010, Ochs und Mühlfeld 2013, Mühlfeld und Ochs 2013). Bei der Trachea wurde eine Modifikation der vertical sections verwendet, um so die Strukturen der Trachealwand identifizieren zu können. Die Methode sieht vor, dass die Proben der Länge nach aufgeschnitten werden, ausgebreitet und innerhalb der ausgebreiteten Ebene randomisiert werden. In dieser Arbeit wurden die Proben nicht aufgeschnitten, weil aufgrund des Trachealknorpels beim Ausbreiten der fixierten Probe Rissartefakte entstehen, die eine Beurteilung der empfindlichen Proben verhindert hätte. Zur Bestimmung der Nervenfasernlänge fand nach entsprechender Modifikation die Methode nach Mühlfeld et al. (2010) am Herzen Anwendung. Da Längenbestimmungen nicht ohne weiteres mit Hilfe von vertical sections durchgeführt werden können (hierfür sind aufwendige Projektionen durch dicke Schnitte notwendig), wurden statt der direkten Bestimmung über die Anschnitte der Nervenfasern pro Fläche in dieser Arbeit Volumen und Oberfläche der Axone bestimmt (Mattfeldt et al. 1990, Graulich et al. 2014). Unter der Modellannahme, dass Axone zylindrische Strukturen sind, wurde aus diesen Daten die Gesamtlänge der Axone der Trachealwand errechnet. Hierdurch ergibt sich eine potentielle Abweichung von der wirklichen Länge, da die Axone natürlich keine perfekt zylindrischen Strukturen sind, es wurde aber davon ausgegangen, dass der Fehler so gering ist, dass er der Identifizierung eines Gruppenunterschieds nicht im Weg steht.

IV.1.3. Immunhistochemie

Bei der Methode der Immunhistochemie werden spezifische Antigene durch Bindung eines Antikörpers mit einer Visualisierungsmethode gezielt sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurde das neuronenspezifische Antigen „Protein-Gene-Product 9.5“ (PGP) ausgewählt, um die Verteilung der Nervenfasern in der Trachea zu beurteilen (Doran et al. 1983). Diese wurde bereits durch Yamamoto et al. (1998) am Kaninchen qualitativ beurteilt. Am Herzen wurde der rab- α -PGP 9.5 Antikörper erfolgreich eingesetzt, um quantitative Daten über die Nervenfasern zu erheben (Mühlfeld et al. 2010, Gruber et al. 2012a, Gruber et al. 2012b). Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten, Antigene mit Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen. Die zunächst in allen weiteren möglichen Methoden gemeinsam verwendete Histoblocklösung (normales Schweineserum 10%, Rinderserum (BSA) 0,1%, TWEEN 20, 0,5% in PBS) bindet unspezifisch an Antigene der Probe. Dies dient der Reduktion unspezifischer Antigen-Antikörper-Interaktionen und somit einer geringeren Hintergrundmarkierung. Die Konzentration der verwendeten Lösung beruht zumeist auf laborinternen Erfahrungen und stellt nur eine von vielen verschiedenen möglichen Varianten dar. Die primären Antikörper binden mit dem spezifischen Fc-Fragment. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden benutzt, um das Antigen sichtbar zu machen. Dies beruht auf den unterschiedlichen Einbettungsverfahren für die Elektronenmikroskopie und für die Fluoreszenzmikroskopie (siehe Methoden).

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Proben mit dem direkt gekoppelten Sekundärantikörper (swine- α -rab-IG-HRP) inkubiert. Das kleine HRP-Molekül ist leicht an Antikörper zu binden und penetriert gut das Gewebe. Die Verstärkung durch Komplexanlagerung von Nickelionen erfolgte durch die Zugabe von Nickelammoniumsulfat. Die Horseradish Peroxidase spaltet aus dem Wasserstoffperoxid, welches in Lösung 2 enthalten ist, Protonen ab. Die Zugabe des Oxidationsproduktes Diaminobenzidin (DAB), ebenfalls in Lösung 1 und 2 enthalten, führt zu einer lichtmikroskopisch sichtbaren Braunfärbung und gleichzeitig zu einem osmiophilen und damit im Elektronenmikroskop stark kontrastgebenden Reaktionsprodukt (Sesack et al. 2006, Johnson und Backman 1983).

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde der Antigen-Antikörperkomplex mit einem sekundären Antikörper markiert, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cy3) gekoppelt war. Dieser bindet spezifisch an das Fc-Fragment der Spezies, aus dem der primäre Antikörper stammt. Die Schwierigkeiten bei der Beurteilung von Ergebnissen dieser

Methode liegen in der Sensitivität, also der Art und Weise, wie genau ein Antikörper an das richtige Antigen bindet, und der Spezifität des Antikörpers, also der Art und Weise, in der ein Antikörper an Strukturen bindet, die nicht der Antigenbindungsstelle entsprechen. Abhängig sind diese Werte u.a. von der Eindringtiefe und der Größe des Antikörpers. Dies zeigt sich am Beispiel des PGP 9.5 I Antikörpers, welcher eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist, jedoch trotzdem nicht alle Axone gleichsam markiert. Dies scheint zumindest in Teilen an den für das Preembedding angefertigten, verhältnismäßig dicken Schnitten (40 µm) zu liegen. Zum anderen scheint jedoch auch die Wahl des Fixierungsgemisches die Antigenität der Proteine verringert und somit nicht alle Bindungsstellen erhalten zu haben. Dadurch kommt bei der elektronenmikroskopischen Auswertung der Nervenfasern der Morphologie der Axone eine wesentliche Bedeutung zu. Neben der Markierung ermöglichte der Einbezug dieses Kriteriums auch die Analyse nicht-markierter Axone und somit eine genauere Bestimmung der Axonlänge. Die ebenfalls mit PGP 9.5 I angefertigten Whole-Mount-Präparate der Nervenfasern waren hilfreich, um einen dreidimensionalen Eindruck zu erhalten, und illustrieren die stereologisch gewonnenen Daten.

IV.2. Ergebnisdiskussion

IV.2.1. Alveolaroberfläche

Ausgehend von den Resultaten bei Anorexie bzw. Mangelernährung an Nagern sollte in der vorliegenden Arbeit getestet werden, ob Tumorkachexie eines fern von der Lunge subkutan implantierten Tumors mit einer verringerten Alveolaroberfläche einhergeht bzw. mit der Ausbildung einer emphysemähnlichen Pathologie wie bei Anorexie bzw. Mangelernährung (Dias et al. 2004, Karlinsky et al. 1986, Riley et al. 1995, Coxon et al. 2004 und Massaro et al. 2007). Hierzu wurden die Alveolaroberfläche und das Volumen der Alveolarregion der Lunge in TG und KG stereologisch bestimmt, wobei beide Parameter sich nicht zwischen den Gruppen unterschieden. Darüber hinaus zeigte sich qualitativ keine Vergrößerung der distalen Atemwege in der TG, wie es für ein Emphysem typisch wäre. Die Summe dieser Ergebnisse in Verbindung mit einer nicht zu beobachtenden Steigerung der Apoptoserate in elektronenmikroskopischen Präparaten muss den Ergebnissen von Dias et al. (2004), Karlinsky et al. (1986), Riley et al. (1995), Coxon et al. (2004) und Massaro et al. (2004) gegenübergestellt werden, welche eben diese Veränderungen bei Nahrungsreduktion in der „Nagerlunge“ beobachtet haben. Da die Existenz des ernährungsbedingten Emphysems in der

Literatur durchaus umstritten ist (Bishai und Mitzner 2008, Pieters et al. 2000), bedarf dies einer genaueren Betrachtung.

Dias et al. (2004) zeigten, dass die Atemvolumina und -widerstände bei Nahrungsreduktion verringert bzw. erhöht waren und führten dies auf die histologisch ermittelte, geringere Menge an LB (s.u.) sowie die Ausbildung eines Emphysems zurück. Hierbei ist zu beachten, dass die funktionelle Analyse nicht nur eine mögliche Verletzungsquelle durch erhöhten intraalveolären Druck darstellt, sondern auch die Zeitspanne zwischen Tod und endgültiger Fixierung verlängert. Währenddessen kann es, ungeachtet der Folgen der durchgeführten Messungen, zum Kollaps einzelner alveolärer Areale kommen. Darüber hinaus werden die in dieser Studie verwendeten Resultate zwar durch eine histologische Analyse bewertet, doch ist weder zu erkennen, nach welchem Kriterium die analysierten Areale ausgewählt wurden, noch kann aus der Oberflächendichte sicher auf die gesamte Lungenoberfläche geschlossen werden. Die physiologischen Resultate eröffnen einen interessanten Einblick in die Atemmechanik bei Mangelernährung, klären jedoch nicht abschließend die hiermit verbundenen morphologischen Veränderungen. Ergebnisse der Gruppe Coxson et al. (2004), welche weniger Lungenparenchym durch die verringerte Volumendichte hyperdenser Areale als Zeichen eines Emphysems diskutieren, beruhen auf Computertomographie-Bildern. Diese Methode ist eine wichtige Option, um morphologische Daten von lebenden Menschen oder Tieren zu erheben (Mechlenburg et al. 2010, Roberts et al. 1997). Bishai und Mitzner (2008) argumentierten, dass diese Ergebnisse jedoch möglicherweise durch die geringere Herzfrequenz sowie den geringeren systemischen Blutdruck bei anorektischen Patientinnen bedingt seien und damit das kardiale Auswurfvolumen verringert sei, wodurch auch die Blutmenge im pulmonalen Schenkel reduziert sei. Somit sei eine Reduktion der Dichte hyperdenser Areale in der Lunge zu erklären. Darüber hinaus konnten sie für den ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Mausstamm (C57BL6/J) zeigen, dass durch Kalorienreduktion und Reduktion des Körpergewichtes um ca. 40% die Lungenvolumina verringert wurden und die Atemwiderstände sowie die Elastizität der Lungen anstiegen. Hieraus wurde geschlossen, dass durch Kalorienreduktion kein Emphysem erzeugt wurde. Eine Gemeinsamkeit der Arbeiten von Dias et al. (2004) und Bishai und Mitzner (2008) ist die möglicherweise auftretende Veränderung im Surfactant-Metabolismus, welche durch die Kalorienreduktion die Lungenfunktion beeinflusst (s.u.).

Um die metabolischen Auswirkungen des Tumors auf die Lunge genauer beurteilen zu können, wurde im Zusammenhang der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weitergehend untersucht, ob Wachstumsfaktoren, die sowohl für die Alveologenese und Angiogenese als auch für die Entstehung eines Emphysems verantwortlich sind, I.) vom Tumor exprimiert werden, II.) über das Blut vermehrt transportiert werden und schließlich III.) dies einen Einfluss auf die Expression der Wachstumsfaktoren in der Lunge hat (Graulich et al. 2012). Hierdurch sollte geklärt werden, ob gegebenenfalls molekularbiologische Veränderungen bereits aufgetreten sind, die morphologisch nicht oder noch nicht zu Veränderungen geführt haben.

Auf einige Wachstumsfaktoren, die bei der Entwicklung der Lunge und deren Pathologien eine entscheidende Stellung einnehmen und durch Graulich et al. (2012) genauer untersucht wurden, soll im Folgenden eingegangen werden.

Zur Familie der Fibroblast Growth Factor (FGF) gehören 23 Mitglieder, von denen FGF-10, -8, -7, und -2 die wichtigsten Vertreter während der Lungenentwicklung sind. Über Tyrosinkinaserzeptoren bindet der mesenchymal gebildete FGF und kontrolliert durch Aktivierung intrazellulärer Signalwege die Zellproliferation, Differenzierung sowie das kontrollierte Ausknospen der Atemwege. Insbesondere FGF-10 als potentester Vertreter der FGF-Familie ist u.a. verantwortlich für die Angiogenese und wird bei verschiedenen Tumoren, wie z.B. dem Mamma-CA gefunden (Theodorou et al. 2004). Zum einen hat FGF-10 eine auto- und parakrine Wirkung, bei der die Expression von z.B. FGF-8 gesteigert wird, was seinerseits die Expression von FGF-10 hemmt (Min et al. 1998). Zum anderen wird die Expression von FGF-10 durch diverse weitere Faktoren beeinflusst, wie das Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP-4), welches als Mitglied der Transforming Growth Factor beta (TGF- β) Superfamilie einer von mindestens drei BMP-Vertretern ist. Es ist wichtig für die Kontrolle der Zellproliferation sowie die proximal-distale Ausrichtung der Lungenentwicklung und Zelldifferenzierung. FGF-10 erhöht die Expression von BMP-4 (Hyatt et al 2004), welches selbst bei erhöhten Werten die Zellproliferation hemmt und den Effekt von FGF-10 antagonisiert. FGF-10 und BMP-4 in Kombination scheinen beide das distale Ausknospen von Alveolen zu verringern. Durch die enge Interaktion zwischen Epithelzellen und Mesenchym kommt es bei ausgewachsenen Individuen durch erhöhte BMP-4-Expression zu einer vermehrten Bildung von Kollagen, Fibronectin und Tenascin C, was für die Entwicklung einer inflammatorisch bedingten Fibrose verantwortlich zu sein scheint (Molloy et al. 2008).

In der sich entwickelnden Lunge übernimmt das aus dem subepithelialen Mesenchym stammende TGF- β 1 eine ähnliche Funktion, indem er die epitheliale Verzweigung verringert, die Bildung extrazellulärer Matrixbestandteile stimuliert und somit das durch FGF-10 vermittelte Lungenwachstum verringert. In der erwachsenen Lunge induzieren erhöhte TGF- β 1-Werte die vermehrte Bildung von Extrazellulärmatrix. Hohe TGF- β 1-Expressionswerte werden wiederum durch BMP-4 gehemmt (Pegorier et al. 2010 und Lee et al. 2006).

Das Auswachsen neuer Blutgefäße in ein Gewebe wird durch Angiogenese-Faktoren wie den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) reguliert, die proliferatorisch und parakrin auf das Gefäßendothel wirken. Neben VEGF-a existieren vier weitere Familienmitglieder: VEGF-b, -c, -d und der Placental Growth Factor (PlGF). VEGF-a wird durch Hypoxie induziert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung des pulmonalen Gefäßsystems, dessen Permeabilität und Vasodilatation von ihm ebenfalls reguliert wird. Außerdem führen zu hohe Konzentrationen bei akuten Lungenverletzungen zu Schrankenstörungen und interstitiellen Ödemen. Bei der Entwicklung eines Lungenemphysems sind verringerte Spiegel an VEGF in der Lunge mit einer gesteigerten Apoptoserate assoziiert (Voelkel et al. 2006). VEGF-c wird besonders in der Lunge exprimiert und führt zur Proliferation von Lymphgefäßen (Kukk et al. 1996). Vom Platelet Derived Growth Factor (PDGF) existieren vier Subtypen: -a und -b, -c und -d. Ursprünglich wurden sie aus Thrombozyten gewonnen, mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sie von verschiedenen Zelltypen während der Entwicklung der Lunge sowie bei der erwachsenen Maus gebildet werden. PDGF-a ist für das Auswachsen distaler Myofibroblasten an den Alveolen wichtig, wie in Doppelknockout Mausstämmen gezeigt wurde (Lindahl et al. 1997). PDGF führt zu einer verminderten Expression von TNF- α und verringert die Transformation der Myofibroblasten. Unter verschiedenen pathologischen Bedingungen konnte eine erhöhte PDGF-a Expression beobachtet werden. Dies war mit einer gesteigerten Anzahl der Myofibroblasten sowie der EZM und der Ausbildung eines Emphysems verbunden (Kimani et al. 2009). Der Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR- γ) ist an der Lungenentwicklung und insbesondere dem Lipidmetabolismus beteiligt und wird genauer in IV.2.1. betrachtet (Wang et al. 2009, Abbot et al. 2010).

Mit Hilfe der PCR wurde gezeigt, dass FGF-10 und VEGF-a sowie PDGF-a, -b, und TGF- β 1 im Tumor exprimiert werden, der Keratinocyte Growth Factor (KGF) jedoch

nicht, weshalb KGF in der weiteren Arbeit nicht berücksichtigt wurde (Graulich et al. 2012). FGF-10 und VEGF-a sowie PDGF-a, -b, und TGF- β 1 werden unter physiologischen Bedingungen in der Lunge gebildet. Da die LLC-Zellen einer Lungenzellreihe abstammen, kann vermutet werden, dass die Wachstumsfaktoren zum einen für die Angiogenese zur Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen, zum anderen aber auch unabhängig davon durch deregulierte mRNA Expression in den Tumorzellen gebildet werden.

Die Expression von FGF-10, VEGF-a und -c, PDGF-a und TGF- β 1, PPAR- γ sowie BMP-4 wurde mit Hilfe der qRT-PCR in Lungenproben bestimmt und zwischen TG und KG verglichen. Abgesehen von VEGF-a und FGF-10, die beide eine Tendenz zu reduzierten Werten in der TG ($p = 0,065$ je) zeigten, waren keine Unterschiede zwischen TG und KG zu erkennen (vgl. Tab. XIV).

Tab. XIV: Quantitative PCR einiger Wachstumsfaktoren in Lungenproben

Parameter Abkürzung	TG	KG	P-Wert
FGF-10	0,61 \pm 0,21	1 \pm 0,35	0,065
PDGF-A	0,91 \pm 0,23	1 \pm 0,20	0,435
TGF- β 1	0,74 \pm 0,30	1 \pm 0,29	0,170
BMP-4	0,78 \pm 0,23	1 \pm 0,23	0,127
VEGFa	0,64 \pm 0,20	1 \pm 0,36	0,065
PPAR- γ	0,89 \pm 0,34	1 \pm 0,26	0,622
VEGFc	0,83 \pm 0,24	1 \pm 0,30	0,440

Legende: FGF-10: Fibroblast Growth Factor 10, PDGF-A: Platelet Derived Growth Factor a, TGF- β 1: Transforming Growth Factor β 1, BMP-4: Bone Morphogenic Protein 4, VEGF-a: Vascular Endothelial Growth Factor -a, PPAR- γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ , VEGF-c: Vascular Endothelial Growth Factor -c (Graulich et al. 2012).

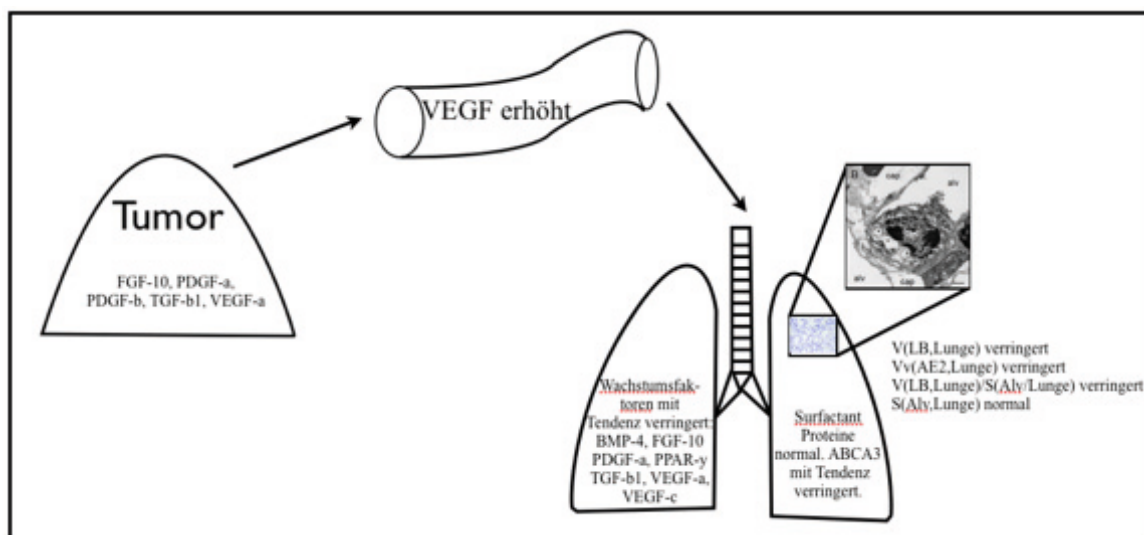
Diese Ergebnisse passen zu den morphologischen Daten, erklären jedoch nicht die tendenzielle Reduktion von VEGF-a und FGF-10. Um dies zu erhellen, wurden Serumproben mit Hilfe von ELISA auf die Proteinmengen beider Wachstumsfaktoren untersucht und zwischen TG und KG verglichen. In den TG-Proben waren signifikant erhöhte Mengen an VEGF im Serum ($p < 0,05$), jedoch nur tendenziell gesteigerte

Mengen an FGF-10 zu messen. Der absolute Anstieg im Serum lag bei beiden Proben im Bereich von jeweils 15 pg/ml.

Es ist zu vermuten, dass die vom Tumor exprimierten Wachstumsfaktoren FGF-10 und VEGF-a sowie PDGF-a, -b und TGF- β 1 ins Blut gelangen und die Serumkonzentration hierdurch steigern. Dies scheint im Sinne einer negativen Feedback-Regulation zu einer geringeren Expression einiger Wachstumsfaktoren (VEGF-a und FGF-10) in der Lunge zu führen.

Abb. XIII: Schaubild der gemessenen Wachstumsfaktoren und deren mögliche Auswirkungen. VEGF wurde vom Tumor produziert und war als einziger gemessener Wachstumsfaktoren im Blut signifikant erhöht. Einige der in der Lunge gemessenen Wachstumsfaktoren zeigen eine Tendenz zur Reduktion. Dies ist mit verringerten intrazellulären Surfactant-Speichern, jedoch konstanter Alveolaroberfläche verbunden.

Anscheinend finden sich zwischen Unterernährung bzw. Anorexie und Tumorkachexie



Gemeinsamkeiten wie die Gewichtsreduktion, aber keine wesentliche Veränderung der Alveolaroberfläche im Sinne einer emphysem-ähnlichen Pathologie. Es liegt nahe zu vermuten, dass dieser Unterschied durch die vom Tumor ausgeschütteten Wachstumsfaktoren hervorgerufen wird, indem diese helfen, trotz des Gewichtsverlusts die Alveolaroberfläche konstant zu halten.

IV.2.2. Surfactant-Metabolismus

Ausgehend von der Hypothese, dass die bei Anorexie bzw. Kalorienreduktion beobachteten veränderten Lungenvolumina (Bishai und Mitzner 2008), Atemvolumina (Pieters et al. 2000) sowie Atemwiderstände mit einer Reduktion der intrazellulären

Surfactant-Speicher (Dias et al. 2004) und des gesamten pulmonalen Surfactants (Bruno et al. 1985) ebenfalls bei Tumorkachexie zu beobachten sind, wurde der Surfactant-Metabolismus in dieser Arbeit bei Tumorkachexie überprüft. Dies geschah, indem stereologisch die Gesamtmenge des in den AE2-Zellen gespeicherten Surfactants bestimmt und auf die gesamte Alveolaroberfläche bezogen wurde, die Expression der Surfactant-Proteine sowie des für den Lipidtransport wichtigen ABCA3-Transporters wie durch Graulich et al. (2012) beschrieben mit Hilfe der qRT-PCR beurteilt wurde und der Quotient aus aktivem (LA) und inaktivem (SA) Surfactant in der BAL-Flüssigkeit durch differentielle Zentrifugation betrachtet wurde.

Bei der stereologischen Analyse des intrazellulären Surfactant-Speichers, den Lamellenkörpern, fiel eine signifikante Reduktion in der TG auf. Insbesondere die Menge intrazellulären Surfactants in Bezug auf die Alveolaroberfläche zeigte eine starke Reduktion in der TG. Surfactant verringert in den Alveolen die Oberflächenspannung und steigert die Compliance der Lunge. SP-B und SP-C, beides hydrophobe Peptide, sind strukturell eng miteinander verwandt. SP-B ist für die Verpackung der LB wichtig (Brasch et al. 2003). SP-A und SP-D sind hydrophile kollagenähnliche Glycoproteine, die für die Ausbildung des Surfactant-Films eine untergeordnete Rolle spielen, jedoch zusammen in der Abwehr gramnegativer Bakterien wichtig sind. Die Reduktion der Lamellenkörper in der TG bleibt unklar, könnte jedoch durch eine verminderte Expression der Surfactant-Proteine bedingt sein. Das Fehlen oder die teilweise Verminderung verschiedener Surfactant-Proteine führt zu verringerter Compliance, gesteigerter Resistance und ist mit verschiedenen Krankheiten wie dem ARDS (Schmidt et al. 2007) verbunden. Bei dem Vergleich der Expressionsmuster der Surfactant-Proteine zwischen TG und KG konnte kein Unterschied festgestellt werden, so dass hier davon ausgegangen werden kann, dass das geringere LB-Volumen in TG nicht durch die Surfactant-Proteine bedingt ist und die intrazelluläre Zusammensetzung der Surfactant-Proteine normal ist. Da jedoch die Surfactant-Proteine nur 10% des Surfactants ausmachen und die darin enthaltenen Phospholipide ca. 90%, blieb die Frage, ob das sezernierte Surfactant funktionsfähig ist. Der Eindruck eines funktionsfähigen Surfactants bestätigte sich in der BAL-Flüssigkeitsanalyse. Hierbei wurde das Verhältnis von LA zu SA, also das Verhältnis von aktivem zu inaktivem Surfactant, untersucht. Dieser Quotient erlaubte zwar die Aussage, dass das produzierte Surfactant funktionsfähig ist, gab jedoch keinen direkten Hinweis, ob es Unterschiede in der Gesamtmenge des intraalveolären Surfactants gibt.

Ein Hinweis hierauf könnte die Expression des ABCA3 Transporters sein ($p = 0,065$), welche eine Tendenz zur Reduktion in TG zeigt. ABCA3 ist ein ATP abhängiger transmembranärer Transporter, der durch ATP-Hydrolyse den Phospholipidtransport über die sogenannte Limiting Membrane der Lamellenkörper ermöglicht (Ridsale et al. 2011). Eine Reduktion des ABCA3-Transporters kann zu einer geringeren Aufnahme der Fettsäuren in den Lamellenkörperchen führen. Wie durch Besnard et al. (2010) gezeigt werden konnte, kommt es durch Abwesenheit des ABCA3-Proteins zur Reduktion der Phospholipide sowie der für den Lipidstoffwechsel entscheidenden Proteine in den AE2-Zellen. Auch die Mutation des ABCA3-Proteins führt zu einer reduzierten Menge an LB sowie SP-B und SP-D und manifestiert sich im klinischen Bild des Unexplained Respiratory Distress Syndrome (URDS) bei Neugeborenen (Brasch et al. 2006). Dies zeigt die Wichtigkeit des ABCA3-Proteins für die Morphogenese der LB. Eine weitere Erklärung scheint jedoch zu sein, dass der Lipidstoffwechsel durch den rapiden Abbau von Lipidspeichern des Körpers, bedingt durch den Tumor, auch die Bildung von Phospholipiden in den AE2-Zellen beeinflusst und gegebenenfalls hierüber zu einer Reduktion der Lamellenkörperchen führt. Lipidspeicher sind in geringem Maße in den AE2-Zellen angelegt, doch beziehen diese aus Lipofibroblasten einen Großteil der Triglyceride für die Surfactant-Synthese (Rehan et al. 2006). Nicht AE2-Zellen, sondern Lipofibroblasten nehmen Triglyceride bei gesteigertem Angebot auf, welche durch die Zugabe von Dexamethason an die AE2-Zellen abgegeben werden. AE2-Zellen ihrerseits produzieren Prostaglandin E₂, was zur Abgabe der Triglyceride aus den Lipofibroblasten an die AE2-Zellen führt (McGowan und Torday 1997). Daher könnte es weitergehend interessant sein, die intrazellulären Speicher der Lipofibroblasten sowie die humorale Interaktion dieser beiden Zellen bei Tumorkachexie zu beobachten, um Aufschluss über die Surfactant-Lipide bei der tumorkachektischen Maus zu erhalten.

Zu den weiteren Regulatoren des pulmonalen Lipid-Metabolismus gehört u.a. PPAR- γ , welcher die Lungenentwicklung verstärkt und an der Lipid- und Glucose-Homöostase beteiligt ist (Wang et al. 2009 und Abbot et al. 2010). Diese Aufgabe erfüllt er insbesondere, indem er die Differenzierung von Fibroblasten zu Lipofibroblasten steuert sowie in diesen, die Bildung von Proteinen, die am Lipidstoffwechsel beteiligt sind, reguliert (z.B. Phosphoenolpyruvat, Carboxykinase und lysosomale saure Kinasen). Seine anti-inflammatorische Wirkung könnte eine therapeutische Option verschiedener Krankheiten darstellen (Simon et al. 2006). Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen

KG und TG bzgl. der Expression von PPAR- γ in der Lunge bei Tumorkachexie beobachtet (Graulich et al. 2012).

Eine weitere Möglichkeit, die die verringerten Surfactant-Speicher erklären könnte, sind die im Serum erhöhten TNF- α -Werte. Die im selben Versuchsaufbau beschriebene Hypoinnervation des linksventrikulären Myokards wurde durch Mühlfeld et al. (2011) u.a. mit den erhöhten TNF- α -Werten im Blutserum (TG: 28.11 ± 1.92 pg/ml; KG: 13.02 ± 4.12 pg/ml) in Verbindung gebracht. Das proinflammatorische Zytokin, welches von verschiedenen Tumorzellen sowie Immunzellen gebildet wird, hemmt in der Zellkultur die Synthese von Surfactant in den AE2-Zellen (Arias-Diaz et al. 1993).

IV.2.3. Blutanalyse

Atemnot ist ein Zustand, der mit vielen unterschiedlichen Organsystemen, wie z.B. der Lunge, dem Herz, der Skelettmuskulatur und dem Blut und deren pathologischen Veränderungen in Verbindung gebracht wird. Wie in weiteren Experimenten in Verbindung mit dieser Arbeit gezeigt werden konnte, entwickeln Mäuse in der TG eine Anämie und Leukozytose, wie dies typisch bei einer ausgeprägten Tumorkachexie zu erwarten ist (Graulich et al. 2012). Dies ist u.a. mit einem geringeren pO_2 , jedoch mit konstantem pCO_2 in der Blutgasanalyse in TG verbunden und wird häufig bei einer respiratorischen Partialinsuffizienz beobachtet. Ventilation, Perfusion und Diffusionskapazität sind Parameter, die die Blutgase beeinflussen können. Die Diffusionskapazität ist neben anderen Mechanismen durch die Diffusionsstrecke limitiert. Da diese in Form der Blutluftschranke mit etwa $2 \mu m$ jedoch konstant bleibt, scheint dies nicht der Grund für die Partialinsuffizienz zu sein. Eher ist sie in der durch Bishai und Mitzner (2008) beschriebenen und gelegentlich zu beobachtenden geringeren Perfusion zu erklären, da, wie gezeigt werden konnte, die Alveolaroberfläche als ein Parameter für die Ventilation konstant bleibt.

Tab. XV: Blutanalyse in TG und KG

Wert	TG	KG	p-Wert
Leukozyten	$7,17 \pm 0,28$	$6,27 \pm 0,52$	0,001

Wert	TG	KG	p-Wert
Erythrozyten	6,22 ± 0,55	8,72 ± 0,72	0,001
Hämatokrit	28,25 ± 2,09	39,41 ± 2,78	0,001
Hämoglobin	10,64 ± 1,06	14,21 ± 1,34	0,001
pH	7,34 ± 0,07	7,32 ± 0,22	1,00
pCO ₂	44,0 ± 2,82	45,3 ± 3,6	0,383
pO ₂	55,1 ± 4,9	59,4 ± 2,6	0,017

Legende: pCO₂, Partialdruck des im Blut gelösten Kohlendioxids; pO₂, Partialdruck des im Blut gelösten Sauerstoffs (Graulich et al. 2012).

IV.2.4. Trachealinnervation

In der vorliegenden Arbeit ist die Frage gestellt worden, ob die durch Mühlfeld et al. (2011) im linksventrikulären Myokard beobachtete Hypoinnervation bei tumorkachektischen Mäusen in vergleichbarer Weise an der Trachea auftritt. Da die Innervation des Respirationstraktes bei pathologischen Veränderungen mit diversen dysregulatorischen Prozessen der Atmung verbunden ist, ist die Frage nicht nur von zellbiologischem Interesse, sondern ein Ansatzpunkt für eine Erklärung der Atemnot bei Tumorpatienten (Barnes 2001, Belvisi 2002). Der Großteil dieser Nervenfasern ist in den luftleitenden Atemwegen und nur sehr vereinzelt in der Alveolarregion der Lunge zu finden, weshalb lediglich in der Trachea die Axonlänge als Maßstab der Innervation des Respirationstraktes bestimmt wurde. Hierfür wurde die von Mühlfeld et al. (2010) beschriebene Methode zur Innervation des Herzens modifiziert und auf die Morphologie der Trachea abgestimmt.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine mit dem Herzen vergleichbare Reduktion der Axonlänge um etwa 50% in der TG beobachtet werden. Diese Reduktion war ebenfalls mit einer geringeren Anzahl an Axonen pro Nervenfasern verbunden, was durch verschiedene Veränderungen erklärt werden kann. Die Reduktion kann sowohl durch den Untergang von ganzen Nervenzellen als auch durch eine geringere Verzweigung der einzelnen Axone entstehen. Um dies zu testen, wird es in weiteren Arbeiten notwendig sein, die Anzahl der Perikaryen in den jeweils Herz und Trachea

zugehörigen Ganglien zu quantifizieren. Des Weiteren bleibt zu klären, ob eine geringere Verzweigung der Axone zu beobachten ist, wozu die Konnektivität der Axone bestimmt werden kann, um die mittlere Länge der einzelnen Axon-Segmente ermitteln zu können. Dies gibt Aufschluss über die genaueren Umstände der Hypoinnervation und weist möglicherweise auf die dahinterstehenden Pathomechanismen hin. Die beobachtete Reduktion der NGF-Expression im Ganglion stellatum sowie im Herzen, welches dem Wachstum von Nervenfasern dient, stellt eine mögliche Erklärung für die beobachtete Hypoinnervation dar (Mühlfeld et al. 2011).

Ziel der Fragestellung war zunächst, die morphologischen Veränderungen der trachealen Innervation der tumorkachektischen Maus zu beschreiben. Dies ist in verschiedener Hinsicht gelungen, wirft jedoch weitere Fragen auf, von denen einige oben genannt wurden. Da jedoch am linksventrikulären Myokard des Mausherzens im selben Tiermodell eine vergleichbare Reduktion der absoluten Axonlänge zu beobachten war (Mühlfeld et al. 2011), scheint hier ein systemischer Prozess vorzuliegen.

Dafür spricht auch, dass neben den sympathischen Nervenfasern, die im linken Ventrikel die Mehrzahl bilden (Lewartowski und Mackiewicz 2015), auch die parasympathischen und sensorischen Nervenfasern, die den Großteil der Nervenfasern der Trachea ausmachen, betroffen sind (McGovern et al. 2015, Nassenstein et al. 2010). Diese Reduktion ist unabhängig von der Menge an glatten Muskelzellen oder den Volumenanteilen des Trachealepithels, welche sowohl in der TG als auch in der KG unverändert blieben. Die in diesem Tiermodell beobachtete Hypoinnervation der von Herz und Atemwegen ist somit ein weiteres morphologisches Korrelat zur beobachteten Dyspnoe der Tumorkachexie und deutet darauf hin, dass die beobachtete tracheale Hypoinnervation im Sinne eines paraneoplastischen Geschehens zu bewerten sein könnte (Bachmann et al. 2009, Fox et al. 2009, Madisson und Lang 2008, Darnell und Posner 2006, Titulaer und Verschuuren 2008).

IV.2.5. Morphologie der Trachea

IV.2.5.1. Knorpel

Unter physiologischen Bedingungen werden Lipidtropfen in Chondrozyten der Trachea gefunden (Anderson et al. 1964). Bei Tumorkachexie werden erhöhte Lipidserumwerte beobachtet, die durch den gesteigerten Abbau angelegter Speicher hervorgerufen werden (Dahlman et al. 2010). Die Erhöhung zirkulierender Lipide führt u.a. dazu, dass Lipide in anderen Zellen, wie Kardiomyozyten (Mühlfeld et al. 2011), aber auch anderen Gewebetypen eingelagert werden. Gesteigerte intrazelluläre Lipidspeicher sind jedoch mit größerem oxidativen Stress und verstärkter Apoptose der Zellen verbunden (Fukuda et al. 2009, Unger und Orci 2000). Daher sollte untersucht werden, ob I.) die Menge an intrazellulären Lipidspeichern durch erhöhten Abbau oder durch erhöhte Lipidserumwerte verändert sind, und II.), ob das Verhältnis von Chondrozyten zur Extrazellulärmatrix durch möglichen Untergang von Zellen verändert ist.

Der Volumenanteil der Lipidspeicher in den Chondrozyten sowie die Volumendichte der Chondrozyten im hyalinen Knorpel ließen keinen Unterschied zwischen den Gruppen erkennen. Auffällig war jedoch, dass sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Tumorgruppe ausgeprägte Lipidspeicher zu beobachten waren. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass durch die geringe Vaskularisierung des Knorpels und die ausschließlich durch Diffusion bedingte Ernährung, das Mikromilieu des Knorpels nicht beeinflusst wird und intrazelluläre Lipidspeicher weder metabolisiert noch durch erhöhte Serum-Lipidwerte beeinflusst werden.

IV.2.5.2. Epithel

Da Veränderungen am Trachealepithel mit verschlechterter mukoziliärer Clearance verbunden sein können, wurde untersucht, ob morphologische Unterschiede zwischen TG und KG beobachtet werden können. Hierbei wurde das Verhältnis von zilientragenden zu nicht-zilientragenden Zellen untersucht und dieses sowohl mit dem Transmissions- als auch mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Bei der Betrachtung des Trachealepithels war stereologisch kein Unterschied im Volumenanteil der zilientragenden und nicht-zilientragenden Zellen zwischen beiden Gruppen zu ermitteln. Jedoch wurde bei der rasterelektronenmikroskopischen Analyse deutlich, dass die Kinozilien der Epithelzellen bei der TG wie verklebt und auf den Zellen liegend wirkten. Mögliche Ursachen könnten zelluläre Veränderungen z.B. des Zytoskeletts

aber auch eine veränderte Zusammensetzung des Oberflächenfilms sein. Letzteres würde gut zu den beobachteten Surfactantveränderungen passen.

V. Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurden Trachea und Lunge von C57Bl6-Mäusen untersucht, bei denen durch subkutane Injektion eines definierten Depots von Lewis-Lung-Carcinoma-Zellen in die Nackenregion eine Tumorkachexie erzeugt wurde. Diese war durch Gewichtsverlust, Anämie und pro-inflammatorische Stoffwechsellaage charakterisiert. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe sollten folgende Fragestellungen überprüft werden:

1. Da es verschiedene Arbeiten gibt, die bei ausgeprägter Kalorienreduktion einen emphysemähnlichen Zustand der Lunge beschrieben haben, sollte untersucht werden, ob bei Tumorkachexie ebenfalls eine Verminderung der Alveolaroberfläche im Sinne eines Emphysems auftritt.

2. In der Literatur ist außerdem beschrieben, dass Kalorienreduktion zu einer Verminderung der Menge und Funktion des pulmonalen Surfactants führt. Es wurde daher die Hypothese untersucht, ob Tumorkachexie ebenfalls zu Veränderungen des intra-alveolären und intrazellulären Surfactants führt.

3. In demselben Tiermodell wurde gezeigt, dass die Innervation des linksventrikulären Myokards bei Tumorkachexie verringert ist. Hier sollte am Beispiel der Trachea untersucht werden, ob eine solche Hypoinnervation auch bei den Atemwegen auftritt.

4. Zusätzlich sollte explorativ der trophische Zustand der Trachea analysiert werden.

Im Vordergrund der verwendeten Methodik standen stereologische und immunhistochemische licht- und elektronenmikroskopische Techniken, die durch andere Methoden wie quantitative RT-PCR und differentielle Surfactant-Zentrifugation ergänzt wurden.

Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Anders als bei Kalorienreduktion konnte in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis auf einen emphysemähnlichen Zustand bzw. eine Verminderung der dem Gasaustausch dienenden Alveolaroberfläche gefunden werden. Dies lässt sich möglicherweise auf vom Tumor gebildete und sezernierte Wachstumsfaktoren zurückführen, die einen Abbau der Alveolaroberfläche verhindern.

2. Analog zur Kalorienreduktion konnte eine Verminderung der intrazellulären Surfactantspeicher dargestellt werden bei gleichzeitig unverändertem Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven intra-alveolären Surfactantformen.
3. Die Innervation der Trachea war auf etwa die Hälfte der Kontrollwerte reduziert, was in etwa den Befunden am Herzen entspricht. Da die meisten Nervenfasern des linken Ventrikels dem sympathischen Nervensystem zuzuordnen sind, während bei der Trachea die meisten Nervenfasern parasympathisch oder sensorisch sind, spricht dies für einen systemischen Effekt der Tumorkachexie auf das periphere Nervensystem.
4. Mit Ausnahme der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des Trachealepithels ließ sich kein quantitativer Unterschied hinsichtlich der Morphologie der einzelnen am Wandaufbau der Trachea beteiligten Gewebe feststellen.

Ein sicheres morphologisches Korrelat für die klinisch bei kachektischen Patienten beobachtete Dyspnoe ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht darstellen. Allerdings könnte eine Verminderung des Surfactants durchaus mit einer erhöhten Atemarbeit vergesellschaftet sein und eine verminderte Innervation der Atemwege zu einer Fehlregulation des normalen Atmungsvorgangs und dessen subjektiver Wahrnehmung im Sinne einer Dyspnoe beitragen. Die Ergebnisse können daher Grundlage für weitere Untersuchungen der für Tumorpatienten quälenden Dyspnoe sein und helfen, neue Ansatzpunkte für zukünftige Therapien dieses Symptoms zu finden.

VI. Summary:

In the present work, the trachea and lungs of C57Bl6 mice were studied, in which, by subcutaneous injection of a defined depot of Lewis lung carcinoma cells in the neck region, a tumor cachexia was produced. This was characterized by weight loss, anemia, and pro-inflammatory metabolism. Compared with a control group, the following questions should be examined:

1. Because there are several works that describe an emphysema like condition of the lungs in a situation of pronounced reduction in caloric intake, it should be examined whether under conditions of cancer cachexia alveolar surface area reduction with emphysema like conditions can be observed.

2. In the literature it is also described that caloric reduction leads to a reduction in the amount and function of pulmonary surfactant. Therefore, the hypothesis was investigated whether tumor cachexia also leads to changes of the intra-alveolar and intracellular surfactant.

3. In the same animal model it has been shown that the innervation of the left ventricular myocardium is decreased in cancer cachexia. It should be examined, whether hypoinnervation also occurs in the tracheal airways.

4. Moreover, the trophic state of the trachea should be analyzed exploratively. In the middle of the methodology stereological and immunohistochemical light and electron microscopy techniques were used, which were supplemented by other methods such as quantitative RT-PCR and surfactant differential centrifugation.

The results of this work can be summarized as followed:

1. Unlike in reduced caloric intake an emphysema-like state or a reduction in the gas exchange serving alveolar surface could not be found in the present study. This may possibly be attributed to by the tumor formed and secreted growth factors which prevent the degradation of the alveolar surface.

2. Similar to the calorie reduction a decrease in intracellular surfactantorganel could be shown. At the same time the natural balance between active and inactive intra-alveolar surfactant was maintained.

3. The innervation of the trachea was reduced to about half of the control group, which corresponds approximately to the findings of the heart. Since most nerve fibers of the left ventricle are attributable to the sympathetic nervous system, while at the trachea

most nerve fibers are parasympathetic or sensory, this indicates a systemic effect of cachexia on the peripheral nervous system.

4. With the exception of the scanning electron microscope view of the tracheal epithelium no quantitative difference in the morphology of the different tissues involved in the wall structure of the trachea could be ascertained.

An unambiguous morphological correlate for the clinically observed dyspnea cachectic patients could not be shown in the present work. However, a reduction of the surfactant may well be associated with an increased respiratory work and a reduced innervation of the airways may contribute to a dysregulation of the normal breathing process and its subjective perception in the sense of dyspnea. The results could be the basis for further investigations of the dyspnea of tumor patients and help to find new targets for future therapies of this symptom.

VII. Literaturangaben:

Abbott BD, Wood CR, Watkins AM, Das KP, Lau CS 2010: Peroxisome proliferator-activated receptor, alpha, beta, and gamma mRNA and protein expression in human fetal tissue. *PPAR Res* 2010:1–19

Amy RWA, Bowes D, Burri PH, Haines J, Thurlbeck WM 1977: Postnatal growth of the mouse lung. *J Anat* 124:131–51

Anderson CE, Ludowieg J, Harper HA, Engelman EP 1964: The composition of the organic component of human articular cartilage. Relationship to age and degenerative joint disease. *J Bone Joint Surg Am* 46:1176–83

Arias-Diaz J, Vera E, Garcia C, Gomez M, Balibra JL 1993: Tumor necrosis factor-alpha inhibits synthesis of surfactant by isolated human type II pneumocytes. *Eur J Surg* 159:541–9

Bachmann J, Ketterer K, Marsch C, Fechtner K, Krakowski-Roosen H, Büchler MW, Friess H, Martignoni ME 2009: Pancreatic cancer-related cachexia: influence on metabolism and correlation to weight loss and pulmonary function. *BMC Cancer* 28:255

Baddeley AJ, Gundersen HJG, Cruz-Orive LM, 1986: Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc* 142:259–76

Barnes PJ 2001: Neurogenic Inflammation in the airways. *Respir Physiol* 125:145–54

Belvisi MG 2002: Overview of the innervation of the lung. *Curr Opin Pharmacol* 2:211–5

Bennani-Baiti N, Walsh D 2011: Animal models of cancer anorexia-cachexia syndrome. *Support Care Cancer* 19:1451–63

Bensch K, Schaefer K, Avery ME 1964: Granular pneumocytes: Electron microscopic evidence of their exocrine function. *Science* 145:1318–9

Besnard V, Matsuzaki Y, Clark J, Xu Y, Wert SE, Ikegami M, Stahlman MT, Weaver TE, Hunt AN, Postle AD, Whitsett JA 2010: Conditional deletion of *Abca3* in alveolar type II cells alters surfactant homeostasis in newborn and adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298:646–59

Bishai JM and Mitzner W 2008: Effect of severe calorie restriction on the lung in two strains of mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295:356–62

Bligh EG, Dyer WJ 1959: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–7

Brasch F, Schimanski S, Mühlfeld C, Barlage S, Langmann T, Aslanidis C, Boettcher A, Dada A, Schroten H, Mildenberg E, Prueter E, Ballmann M, Ochs M, Johnen G, Griesse M, Schmitz G 2006: Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 174:571–80

Brasch F, Johnen G, Winn-Brasch A, Guttentag SH, Schmiedl A, Kapp N, Suzuki Y, Müller KM, Richter J, Hawgood S, Ochs M 2003: Surfactant protein B in type II pneumocytes and intra-alveolar surfactant forms of human lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:449–58

Bruno JV, McMahon KE, Farrell PM 1985: Lung Surfactant Phospholipids as related to hydration and choline status of fasted rats. *J Nutr* 115:85–92

Busquets S, Figueras MT, Fuster G et al. 2004: Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res* 60:5488–93

Clara M 1937: Zur Histobiologie des Bronchialepithels. *Z Mikrosk Anat Forsch* 321–47

Coats AJS 2002: Origin of symptoms in patients with cachexia with special reference to weakness and shortness of breath. *Int J Cardiol* 85:133–9

Copland I und Post M 2004: Lung development and fetal lung growth. *Paed Resp Rev* 5:259–64

Coxson HO, Chan IAT, Mayo JR, Hlynsky J, Nakano Y, Birmingham CL 2004: Early emphysema in patients with Anorexia nervosa. *Am J Respir Crit Care Med* 170:748–52

Crapo JD, Young SL, Fram EK, Pinkerton KE, Barry BE, Crapo RO 1983: Morphometric characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs. *Am Rev Respir Dis* 128:42–6

Curran-Everett D, Benos DJ 2004: Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society. *Physiol Genomics* 18:249–51

Dahlman I, Mejhert N, Linder K, Agustsson T, Mutch DM, Kulyte A, Isaksson B, Permert J, Petrovic N, Nedergaard J, Sjölin E, Brodin D, Clement K, Dahlman-Wright K, Ryden M, Arner P 2010: Adipose tissue pathways involved in weight loss of cancer cachexia. *Br J Cancer* 102:1541–48

Darnell RB, Posner JB 2006: Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. *Semin Oncol* 33:270–98

Das SK, Eder S, Schauer S, Diwoky C, Temmel H, Guertl B, Gorkiewicz G, Tamilarasan KP, Kumari P, Trauner M, Zimmermann R, Vesely P, Haemmerle G, Zechner R, Hoefler G 2011: Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science* 333:233–8

Dey RD, Shannon WA, Said SI 1981: Localization of VIP- immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dogs, cat, and human subjects. *Cell Tissue Res* 220:231–8

Dias CM, Passaro CP, Cagido VR, Einicker-Lamas M, Lowe J, Negri EM, Capelozzi VL, Zin WA, Rocco PRM 2004: Effects of undernutrition on respiratory mechanics and lung parenchyma remodeling. *J Appl Physiol* 97:1888–98

Doran JF, Jackson P, Kynoch PA, Thompson RJ 1983: Isolation of PGP 9.5, a new human neuron-specific protein detected by high resolution two-dimensional electrophoresis. *J Neurochem* 40:1542–7

Fick A 1855: Ueber Diffusion. *Annalen der Physik* 170:59–86

Fischer A, Mayer B, Kummer W 1996: Nitric oxide synthase in vagal sensory and sympathetic neurons innervating the guinea-pig trachea. *J Auton Nerv Syst* 56:157–60

Fox KM, Brooks JM, Gandra SR, Markus R, Chiou CF 2009: Estimation of cachexia among cancer patients based on four definitions. *J Oncol* 2009:693458

Friday EE 1970: Effect of food and water deprivation on surface activity of lungs of rats. *J Appl Physiol* 29:493–98

Fukuda T, Sumi T, Nobayama H, Yoshida H, Matsumoto Y, Yasui T, Honda K-I, Ishiko O 2009: Multiple organ failure of tumor bearing rabbits in cancer cachexia is caused by apoptosis of normal organ cells. *Int J Oncol* 34:61–7

Gehr P, Bachofen M, Weibel ER 1978: The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol* 32:121–40

George G, Hook GE 1984: The pulmonary extracellular lining. *Environ Health Perspect* 55:227–37

Goldmann T, Kähler D, Schultz H, Abdullah M, Lang DS, Stellmacher F, Vollmer E 2009: On the significance of surfactant protein-A within the human lungs. *Diagn Pathol* doi: 10.1186/1746-1596-4-8

Graulich T, Das SK, Wessels L, Krasteva G, Ruppert C, Hoefler G, Mühlfeld C 2012: Cancer cachexia alters intracellular surfactant metabolism but not total alveolar surface area. *Histochem Cell Biol* 138:803–13

Graulich T, Das SK, Wessels L, Kummer W, Hoefler G, Mühlfeld C 2014: Effects of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma on the innervation of the mouse trachea. *Auton Neurosci* 183:106–10

Griffiths G: *Fine Structure Immunohistochemistry*. Springer Verlag, Berlin 1993

Gruber C, Kohlstedt K, Loot AE, Fleming I, Kummer W, Mühlfeld C 2012a: Stereological characterization of left ventricular cardiomyocytes, capillaries, and innervation in the nondiabetic, obese mouse. *Cardiovasc Pathol* 21:346–54

Gruber C, Nink N, Nikam S, Magdowski G, Kripp G, Voswinckel R, Mühlfeld C 2012b: Myocardial remodelling in left ventricular atrophy induced by caloric restriction. *J Anat* 220:179–85

Gundersen HJ, Jensen EB 1987: The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147:229–63

Hamvas A 2010: Evaluation and management of inherited disorders of surfactant metabolism. *Chin Med J* 123:2943–7

Ho C, Tong KM, Ramsden K, Ionescu DN, Laskin J 2015: Histologic classification of non-small-cell lung cancer over time: reducing the rates of not-otherwise-specified. *Curr Oncol* 22:164–70

Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER 2010: How to measure lung structure-what for? On the „Standards for the quantitative assessment of lung structure“ *Respir Physiol Neurobiol* 171:72–4

Hyatt BA, Shangguan X, Shannon JM 2004: FGF-10 induces SP-C and PMP-4 and regulates proximal-distal patterning in embryonic tracheal epithelium. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 287:1116–26

Hyde DM, Harkema JR, Tyler NK, Plopper CG 2006: Design-based sampling and quantitation of the respiratory airways. *Toxicol Pathol* 34:286–95

Johnson O und Backman J 1983: Enhancement of immunoperoxidase staining using osmium tetroxide. *J Neurosci Methods* 7:185–93

Karlinsky JB, Goldstein RH, Ojerskis B, Snider GI 1986: Lung mechanics and connective tissue levels in starvation-induced emphysema in hamsters. *Am J Physiol* 251:282–8

Kimani PW, Holmes AJ, Grossmann RE, McGowan SE 2009: PDGF-Ra gene expression predicts proliferation, but PDGF-a suppresses transdifferentiation of neonatal mouse lung myofibroblasts. *Resp Res* 10:119

Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K 1996: VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 122:3829-37

Kummer W, Fischer A, Kurkowski R, Heym C 1992: The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience* 49:715–37

Kummer W, Lips KS, Pfeil U 2008: The epithelial cholinergic system of the airway. *Histochem Cell Biol* 130:219–34

Laitinen A 1985: Ultrastructural organisation of intraepithelial nerves in the human airway tract. *Thorax* 40:488–92

Lee CG, Kang H-R, Homer RJ, Chupp G, Elias JA 2006: Transgenic modeling of transforming growth factor- β 1(beta). *Proc Am Thorac Soc* 3:418–23

Leitinin A 1985: Ultrastructural organisation of intraepithelial nerves in human airway tract. *Thorax* 40:488–92

Lewartowski B, Mackiewicz U 2015: The non-neuronal heart's acetylcholine in health and disease. *J Physiol Pharmacol* 66:773–8

Lindahl P, Karlsson L, Hellström M, Gebre-Medhin S, Willetts K, Heath JK, Betsholtz C 1997: Alveogenesis failure in PDGF- α -deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development* 124:3943–53

Loberg RD, Bradley DA, Tomlines SA, Chinnaiyan AM, Pienta KJ 2007: The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. *CA Cancer J Clin* 57:225–41

Lovera M, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano J, Agell N, López-Soriano FJ, Garcia I, Argilés JM 1998: Protein turnover in skeletal muscle of tumor bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1. *Cancer Lett* 130:19–27

Lundberg JM, Terenius L, Hökfelt T, Goldstein M 1983: High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci Lett* 42:167–72

MacDonald N 1995: Suffering and dying in cancer patients. Research frontiers in controlling confusion, cachexia, and dyspnea. *West J Med* 163:278–86

Maddison P, Lang B 2008: Paraneoplastic neurological autoimmunity and survival in small-cell lung cancer. *J Neuroimmunol* 201:159–62

Mann SP 1971: The innervation of mammalian bronchial smooth muscle: the localization of catecholamines and cholinesterases. *Histochem J* 3:319–31

Massaro D, De Carlo Massaro G 2004: Hunger disease and Pulmonary Alveoli. *Am J Resp Crit Care Med* 170:723–24

Massaro D, Alexander E, Reiland K, Hoffman EP, Massaro GD, Clerch LB 2007: Rapid onset of gene expression in lung supportive formation of alveolar septa, induced by refeeding mice after calorie restriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:1313–26

Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Moller P 1990: Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc* 159:301–17

Mayhew TM 1991: The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Exp Physiol* 76:639–65

McGowan SE und Torday JS 1997: The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contribution to alveolar deveolopment. *Annu Rev Physiol* 59:43–62

McGovern AE, Driessen AK, Simmons DG, Powell J, Davis-Poynter N, Farrell MJ, Mazzone SB 2015: Distinct brainstem and forebrain circuits receiving tracheal sensory neuron inputs revealed using a novel conditional anterograde transsynaptic viral tracing system. *J Neurosci* 35:7041–55

Mechlenburg I, Nyengaard JR, Gelineck J, Soballe K, Troelsen A 2010: Cartilage thickness in the hip measured by MRI and stereology before and after periacetabular osteotomy. *Clin Orthop Relat Res* 468:1884–90

Michel RP, Cruz-Orive LM 1988: Application of Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. *J Microsc* 150:117–36

Min H, Danilenko DM, Scully SA, Bolon B, Ring BD, Tarpley JE, DeRose M, Somonet WS 1998: FGF-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev* 12:3156–61

Molloy EL, Adams A, Moore JB, Masterson JC, Madrigal-Estebas L, Mahon BP, O'Dea S, 2008: BMP4 induces an epithelial-mesenchymal transition-like response in adult airway epithelial cells. *Growth Factors* 26:12–22

Montgomery PQ, Stafford ND, Stolinski C 1990: Ultrastructure of human fetal trachea: A morphological study of the luminal and glandular epithelia at the mid-trimester. *J Anat* 173:43–59

Mühlfeld C, Ochs M 2013: Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 2: stereological parameters and study designs in various diseases of the respiratory tract. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305:205–21

Mühlfeld C, Rothen-Rutishauser B, Vanhecke D, Blank F, Gehr P, Ochs M 2007: Visualization and quantitative analysis of nanoparticles in the respiratory tract by transmission electron microscopy. *Part Fibre Toxicol* 4:11

Mühlfeld C, Papadakis T, Krasteva G, Nyengaard JR, Hahn U, Kummer W 2010: An unbiased stereological method for efficiently quantifying the innervation of the heart and other organs based on total length estimations. *J Appl Physiol* 108:1402–9

Mühlfeld C, Das SK, Heinzel FR, Schmidt A, Post H, Schauer S, Papadakis T, Kummer W, Hoefler G 2011: Cancer induces cardiomyocyte remodeling and hypoinnervation in the left ventricle of the mouse heart. *PLoS One* 6:e20424

Nassenstein C, Taylor-Clark TE, Myers AC, Ru F, Nandigama R, Bettner W, Udem BJ 2010: Phenotypic distinctions between neural crest and placodal derived vagal C-fibres in mouse lungs. *J Physiol* 588:4769–83

Nyengaard JR, Gundersen HJG 1992: The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. *J Microsc* 165:427–31

Ochs M 2005: A brief update on Lung Stereology. *Journal of Microscopy* 222:188–200

Ochs M, Mühlfeld C 2013: Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305:15–22

Pajak B, Orzechowska S, Pijet M, Pogorzelska A, Gajkowska B, Orzechowski A 2008: Crossroads of cytokine signaling—the chase to stop muscle cachexia. *J Physiol Pharmacol* 59:251–64

Pegorier S, Campell GA, Kay AB, Lloyd CA 2010: Bone Morphogenic Protein (PMP)-4 and BMP-7 regulate differentially Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 in normal human lung fibroblasts (NHLF). *Resp Res* 11:85

Pieters T, Boland B, Beguin C, Veriter C, Stanescu D, Frans A, Lambert M 2000: Lung function study and diffusion capacity in anorexia nervosa. *J Intern Med* 248:137–42

Plato M, Kummer W, Haberberger RV 2006: tructural and neurochemical comparison of vagal and spinal afferent neurons projecting to the rat lung. *Neurosci Lett* 395:215–9

Plopper CG, Halsebo JE, Berger WJ, Sonstegard KS, Nettesheim P 1983: Distribution of nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells in intra- and extrapulmonary airways of the rabbit. *Exp Lung Res* 5:79–98

Rau GA, Vieten G, Haitsma JJ, Freihorst J, Poets C, Ure BM, Bernhard W 2004: Surfactant in newborn compared with adolescent pigs: adaptation to neonatal respiration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:694–701

Reznik GK 1990: Comparative Anatomy, Physiology, and Function of the Upper Respiratory Tract. *Environmental Health Perspectives* 85:171–6

Rehan VK, Sugano S, Wang Y, Santos J, Romero S, Dasgupta C 2006: Evidence for presence of lipofibroblasts in human lung. *Exp Lung Res* 32:379–93

Ridsale R, Na C-L, Xu Y, Greis KD, Weaver T 2011: Comparative proteomic analysis of lung lamellar bodies and lysosome-related organelles. *PLoS* 10:e0142287

Riley DJ, Thakker-Varia S 1995: Effect of diet on lung structure, connective tissue metabolism and gene expression. *J Nutr* 125:1657–60

Roberts N, Cruz-Orive LM, Bourne M, Herfkens RJ, Karwoski RA, Whitehouse GH 1997: Analysis of cardiac function by MRI and stereology. *J Microsc* 187:31–42

Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A 1970: Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5:494–6

Sesack SR, Miner LE, Omelchenko N 2006: Preembedding immunoelectron Microscopy: Application for studies of the nervous system. *Neuroanatomic Tract Tracing 3: Molecules Neurons and Systems*. New York: Springer Science 6–71

Scherle W 1970: A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 26:57–60

Schmidt R, Markert P, Ruppert C, Wygrecka M, Kuchenbuch T, Walmrath W, Seeger W, Guenther A 2007: Time-dependent changes in pulmonary surfactant function and composition in acute respiratory distress syndrome due to pneumonia or aspiration. *Respir Res* 8:55

Schols AMWJ 2002: Pulmonary cachexia. *Int J of Card* 85:101–10

Sherry BA, Gelin J, Fong Y, Marano M, Wei H, Cerami A, Lowry SF, Lundhold KG, Moldawer LL 1989: Anticachectin/tumor necrosis factor- α antibodies attenuate development of cachexia in tumor models. *FASEB J* 3:1956–62

Simon DM, Arikan MA, Srisuma S, Bhattacharya S, Tsai LW, Ingenito EP, Gonzalez F, Shapiro SD, Mariani TJ 2006: Epithelial cell PPAR γ contributes to normal lung maturation. *FASEB J* 20:710–29

Sterio DC 1984: The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134:127–36

Stone KC, Mercer RB, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD 1992: Allometric relationships of cell number and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:235–43

Taraseviciene-Stewart L, Voelkel NF 2008: Molecular pathogenesis of emphysema. *J Clin Invest* 118:394–402

Thet LA, Alvarez H 1982: Effect of hyperventilation and starvation on rat lung mechanics and surfactant. *Am Rev Respir Dis* 162:286–90

Theodorou V, Boer M, Weigelt B, Jonkers J, van der Valk M, Hilken J 2004: FGF-10 is an oncogene activated by MMTV insertional mutagenesis in mouse mammary tumors and overexpressed in a subset of human breast carcinomas. *Oncogene* 23:6047–55

Titulaer MJ, Verschuuren JJ 2008: Lambert-Eaton myasthenic syndrome: tumor versus nontumor forms. *Ann N Y Acad Sci* 1132:129–34

Togni V, Ota CC, Folador A et al. 2003: Cancer Cachexia and tumor growth reduction in walker 256 tumor bearing rats supplemented with N-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. *Nutr Cancer* 46:52–8

Tolosa L, Morla M, Iglesias A, Busquets X, Llado J, Olmos G 2005: IFN-gamma prevents TNF-alpha-induced apoptosis in C2C12 myotubes through down-regulation of TNF-R2 and increased NF-kappaB activity. *Cell Signal* 17:1333–42

Toomey D, Redmond HP, Bouchler-Heyes D 1995: Mechanisms mediating cancer cachexia. *Cancer* 76:2418–26

Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Ngyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A, Lowry S 1988: Cachectin/Tumor necrosis factor induces cachexia anemia and inflammation. *J Exp Med* 167:1211–27

Unger RH, Orci L 2000: Lipotoxic diseases of nonadipose tissue in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:28–32.

Vedel-Jensen EB und Gundersen HJG 1993: The rotator. *J Microsc* 170:35–44

Voelkel NF, Vandivier W, Tudor R 2006: Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:209–21

Wang Y, Santos J, Sakurai R, Eugene S, Cerny L, Torday JS, Rehan VK 2009: Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- γ agonists enhance lung maturation in neonatal rat model. *Pediatr Res* 65:150–5

Weaver TE, Na CL, Stahlman M 2002: Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Semin Cell Dev Biol* 13:263–70

Weibel ER 2009: What makes a good lung? *Swiss Med Wkly* 139:375–86

Weibel ER, Gomez M 1962: Architecture of the human lung. *Science* 137:577–85

Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF 1966: Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 30:23–38

Weis HS, Jurrus E 1971: Starvation on compliance and surfactant of the rat lung. *Resp Physiol* 12:123–9

Winkelmann A, Noack T 2010: The Clara cell: a "Third Reich eponym"? *Eur Respir J* 36:722–7

Wirkes A, Jung K, Ochs M, Mühlfeld C 2010: Allometry of the mammalian intracellular pulmonary surfactant system. *J Appl Physiol* 109:1662–9

Yamamoto Y, Otsuka T, Atoji Y, Suzuki Y 1998: Morphological and quantitative study of the intrinsic nerve plexus of the canine trachea as revealed by immunohistochemical staining of protein gene product 9.5. *Anat Rec* 250:438–47

Zetterberg A, Engström W 1981: Glutamine and the regulation of DNA replication and cell multiplication in fibroblasts. *J Cell Physiol* 108:365–73

VIII. Materialübersicht:

Name	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Seelze
Entellan	Merck, Darmstadt
Fetales Rinderserum (FBS)	Tierklinik Gießen
Gewebekleber Histoacryl	Aesculap, Tuttlingen
Glutamine	Sigma-Aldrich, Seelze
Isofluran	Baxter AG, Volketswil
Leit C Kleber	Neubauer, Münster
Lewis Lung Carcinoma-Zellen (LLC)	ATCC, VC USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Normales Schweineserum	(DAKO, Hamburg)
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich, Seelze
Penicillin-Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Propylenoxid	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Tissue-Tek® OCT Compound	Sakura Fintek, Staufen
Triton	Sigma-Aldrich, Seelze
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
1,2-Dimethoxypropan	Merck- Schuchardt, Hohenbrunn

VIII.1. Puffer und Lösungen:

Epoxidharz: (Agar 100 Resin®):

48 g Epoxy resin (Agar Scientific Ltd., Stansted Essex, England)

32 g DDSA (s.o.)

20 g MNA (s.o.)

vor Gebrauch 0,3 g BDMA dazugeben (s.o.)

Fixans:

Glutardialdehyd (GDA): 1,5% (Merck, Darmstadt)

+ Paraformaldehyd (PFA): 1,5% (Merck, Darmstadt)

in Hepes-Puffer 0,15 M

dazu werden 500 ml Hepes-Puffer 0,3 M mit
60 ml 25% GDA
60 ml 25% PFA
auf 900 ml Aqua dest. aufgefüllt pH = 7,35
auf 1000 ml auffüllen

gepuffertes Glycerol:

50 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung (Merck, Darmstadt)
mit 0,5 M Dinatriumcarbonat (Merck, Darmstadt)
pH-Wert 8,6 einstellen

Hepes-Puffer:

39,04 g Hepes-Puffer + 380 ml Aqua dest. pH mit HCl auf 7,35 (Merck, Darmstadt)
einstellen und auf 500 ml auffüllen entspricht 0,15 M

Histoblocklösung:

normales Schweineserum (10%), Rinderserum (BSA) (0,1%), TWEEN 20 (0,5%) in
PBS

Lösung 1:

Nickelverstärkung (25 mM): 0,2 g Nickelammoniumsulfat in 20 ml Tris HCl lösen
+ 250 µl von DAB Stammlösung (10µg/ml)

Lösung 2:

Lösung 1 + 1,2 µl H₂O₂

Paraformaldehyd (PFA):

15 g PFA in 50 ml Aqua dest. auf 65 °C erwärmt mit NaOH auf pH 7,4
(Merck, Darmstadt)
eingestellt auf 4% mit PBS verdünnt

Phosphatpuffer Salzlösung (PBS):

Lösung A: 28,75 ml, Lösung B: 96,20 ml ad. 5000 ml Aqua dest., pH = 7,4
Lösung A: 0,2 M 31,2 g/l NaH₂PO₄ x 2H₂O in Aqua dest. (Roth, Karlsruhe)

Lösung B: 0,2 M 35,6 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in Aqua dest. (Roth, Karlsruhe)

Phosphatpuffer Salzlösung + Salzlösung (PBS+S):

siehe PBS + 22 g NaCl

Richardson Färbung:

0,5 g AZUR II (Merck, Darmstadt)

+ 0,25 g Methylenblau (Schmidt u. Co
Untertürkheim)

+ 0,25 Borax (Merck, Darmstadt)

+ 100 ml Aqua dest.

4 Wochen Reifung, vor dem Gebrauch filtrieren

Reynold's Lösung:

1,33 g Bleinitrat (Sigma Aldrich)

1,76 g Na-3-citrat-2-hydrat (Merck, Darmstadt)

30 ml Aqua dest. abgekocht

1 min schütteln

nach 30 min 8 ml 1 M NaOH hinzugeben

mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen

pH = 12 einstellen

Saccharoselösung 18%:

18 g Saccharose in 100 ml Aqua dest. (Merck, Darmstadt)

Technovit:

Präinfiltration: Basislösung Technovit + 100% Aceton im Verhältnis 1:1

(Heraeus Kulzer, Wehrheim)

Infiltration: 100 ml Basislösung Technovit + 1 g Härter I (s.o.)

Polymerisation: 15 ml Vorbereitungslösung + 1 ml Härter II (s.o.)

Tris HCl:

Stammlösung 1: 21,03 g Tris + 1000 ml Aqua dest. (Roth, Karlsruhe)

Stammlösung 2: 0,1 M HCl

44,7 ml Stammlösung 1 + 42,0 ml Stammlösung 2

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

X. Danksagungen:

Für die vielfältige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Christian Mühlfeld. Sowohl bei der Entwicklung der Fragestellung, bei der strukturellen Durchführung aber auch bei der Niederschrift war er eine außerordentliche Hilfe. In vielen beratenden und freundschaftlichen Gesprächen hat er es stets geschafft, den Fokus auf die wesentlichen Fragestellungen zu lenken, motivierend geholfen, den Überblick nicht zu verlieren, und dabei Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten und Denken geweckt.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerald Höfler, Herrn Dr. Suman Kumar Das und Silvia Schauer für die Überlassung der Gewebeproben aus den Tierexperimenten.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer für anregende Ideen und die Möglichkeit, seine Infrastruktur nutzen zu dürfen.

Dem Verein zur Förderung der Krebsforschung in Gießen e.V. der durch Finanzierung von Materialien zur Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen hat, sei ebenso wie dem Boehringer Ingelheim Fonds für den Travel Grant zur Teilnahme am Stereologie Workshop der Universität Bern, gedankt.

Für die hervorragende Einarbeitung, gute Ratschläge und eine freundschaftliche Atmosphäre danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der JLU-Gießen. Hierbei gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ, Gerhard Kripp, Gerd Magdowski, Tamara Papadakis und Petra Mermer. Dr. Clemens Ruppert danke ich für die Bearbeitung der BAL-Proben.

Insbesondere sei an dieser Stelle auch Ariane Latz und Lars Wessels für die langjährige Freundschaft, stets anregende, kontroverse und zielführende Gespräche gedankt.

XI. Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

XII. Eigene Publikationen:

Paper

Karnati S, Graulich T, Oruqaj G, Pfreimer S, Seimetz M, Stamme C, Mariani TJ, Weissmann N, Mühlfeld C, Baumgart-Vogt E 2016: Postnatal development of the bronchiolar club cells of distal airways in the mouse lung: stereological and molecular biological studies. Cell Tissue Res 2016 Jan 21 [Epub ahead of print]

Graulich T, Das SK, Wessels L, Kummer W, Hoefler G, Mühlfeld C 2013: Effects of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma on the innervation of the mouse trachea. Auton Neurosci. Auton Neurosci 183:106–10

Graulich T, Das SK, Wessels L, Krasteva G, Ruppert C, Hoefler G, Mühlfeld C 2012: Cancer cachexia alters intracellular surfactant metabolism but not total alveolar surface area. Histochemistry and Cell Biology 138: 803–13

Vortrag

Graulich T, Spross C, Loitsch T, Rahm S, Zdravkovic V, Erhardt J, Behrend H (2014): Patella Baja and Pseudo-Patella Baja after navigated standard TKA – is there a clinical relevance? SGOT Jahrestagung St. Gallen

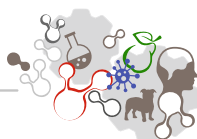
Abstracts

Graulich T, Das SK, Wessels L, Kummer W, Hoefler G, Mühlfeld C 2013: Differential effect of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma on tracheal innervation in mice. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Onkologie 36:267

Mühlfeld C, Graulich T, Das SK, Krasteva G, Wessels L, Ruppert C, Kummer W, Hoefler G 2012: Tracheal Innervation And Alveolar Epithelial Type II Cell Lamellar Bodies Are Reduced In The Cancer Cachectic Mouse. Am J Respir Crit Care Med DOI: 10.1164/ajrccm

Graulich T, Das SK, Wessels L, Krasteva G, Ruppert C, Kummer W, Hoefler G, Mühlfeld C 2011: Alveolar surface area and tracheal innervation in the cancer-cachectic mouse. Deutsche Anatomische Gesellschaft DOI 10.3337/anatges.2011.0014

Graulich T, Das SK, Wessels L, Krasteva G, Ruppert C, Hoefler G, Mühlfeld C 2011: Effects of cancer cachexia on the alveolar morphology of the lung. European Respiratory Journal 38:55



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6616-1



9 78 3 835 19 6616 1